

Aus den Professuren für Bodenkunde und Phytomedizin  
der Agrar- und Umweltwissenschaftlichen Fakultät

**Interaktion von Mykorrhizierung und Rostpilzinfektion  
an Pappeln und Weiden (*Populus* und *Salix* spp.)  
im Kurzumtrieb**

Dissertation  
zur  
Erlangung des akademischen Grades  
Doktor der Agrarwissenschaften  
(doctor agriculturae (Dr. agr.))  
an der Agrar- und Umweltwissenschaftlichen Fakultät  
der Universität Rostock

vorgelegt von  
Dipl.-Biol. Cornelia Pfabel

**Betreuer:**

PD Dr. habil. Christel Baum

PD Dr. habil. Christine Struck

**Gutachter:**

PD Dr. habil. Christel Baum, Universität Rostock

PD Dr. habil. Christine Struck, Universität Rostock

Prof. Dr. Martin Weih, Schwedische Universität für Agrarwissenschaften (SLU), Uppsala,  
Schweden

Prof. Dr. Hermann Heilmeyer, Technische Universität Bergakademie Freiberg

**Tag der Einreichung:**

19.12.2014

**Tag der Verteidigung:**

16.06.2015

## Veröffentlichungen der Dissertation

Teilergebnisse dieser Arbeit wurden nach Absprache mit den Mentoren dieser Arbeit bereits in folgenden Beiträgen veröffentlicht:

### Publikationen

Pfabel C, Baum C & Struck C (2010): Impact of mycorrhiza formation on the infection of poplar with rust fungi. In: Abstracts of oral and poster presentations given at the 4th International Rusts of Forest Trees Conference, Florence, Italy. *Phytopathol. Mediterr.* 49:421-434.

Pfabel C, Eckhardt K-U, Baum C, Struck C, Frey P & Weih M (2012): Impact of ectomycorrhizal colonisation and rust infection on the secondary metabolism of poplar (*Populus trichocarpa* × *deltooides*), *Tree Physiol.* 32(11):1357-64. DOI: 10.1093/treephys/tps093.

### Tagungsbeiträge

Pfabel C, Grolík F, Pentz T-Å & Landman J: Das Department Maritime Systeme. 2. Interdisziplinäres Forschungsseminar der INF Rostock, 25. März 2010, Institut für Ostseeforschung (IOW), Warnemünde.

Pfabel C, Baum C, Struck C & Weih M: Impact of mycorrhiza formation on the infection of poplar with rust fungi. „4th international rusts of forest trees working party conference“ (IUFRO), 3. - 6. Mai 2010, Florenz, Italien.

Pfabel C, Baum C, Struck C & Weih M: Auswirkungen von Mykorrhizierung auf die Resistenz von Pappeln gegenüber Rostpilzbefall. 2. gemeinsamer Doktorandentag im AgrosNet-Verbund, 23. Juni 2010, Universität Rostock, Rostock.

Pfabel C, Eckhardt K-U, Baum C, Struck C & Weih M: Effects of mycorrhizal colonization on rust infected poplar. Forschungsaufenthalt, Abteilung „Interactions Arbres-

Microorganismes“. 16. - 20. August 2010, INRA, Nancy-Universität, Champenoux, Frankreich.

### **Posterpräsentationen**

Pfabel C, Baum C & Struck C: Impacts of mycorrhiza formation on rust infection. 2. Interdisziplinäres Forschungsseminars der INF, 25. März 2010, Institut für Ostseeforschung (IOW), Warnemünde.

Pfabel C, Baum C & Struck C: Impact of mycorrhiza colonization on rust infected foliage of poplar. Konstituierende Sitzung des Beirats der MTS, 21. November 2011, Fraunhofer-Anwendungszentrum, Rostock.

# Inhaltsverzeichnis

<b>Inhaltsverzeichnis</b>	<b>I</b>
<b>Abbildungsverzeichnis</b>	<b>IV</b>
<b>Tabellenverzeichnis</b>	<b>V</b>
<b>Abkürzungsverzeichnis</b>	<b>VII</b>
<b>1. EINLEITUNG</b>	<b>1</b>
1.1 Kurzumtriebsplantagen zur Biomasseerzeugung	1
1.2 Pappel- und Weidenklone für die Kurzumtriebswirtschaft	5
1.3 Ektomykorrhizierung und ihr Einfluss auf die blattchemische Zusammensetzung der Wirtspflanze	8
1.4 Pathogene, Fraßschädlinge und Pflanzenschutzmaßnahmen an <i>Populus</i> und <i>Salix</i> spp.	10
1.4.1 Allgemeine Gefährdung und Schutzmaßnahmen	10
1.4.2 Rostpilze ( <i>Melampsora</i> spp.)	10
1.5 Pflanzliche Mechanismen der Abwehr von Pathogenen	13
1.6 Problemstellung, Arbeitshypothese und Zielsetzung	15
<b>2. MATERIAL UND METHODEN</b>	<b>18</b>
2.1 Versuchsdesign des Gefäßversuchs	18
2.2 Biologisches Material für den Gefäßversuch	19
2.2.1 <i>In-vivo</i> Kulturen der Wirtspflanze `Beaupré`	19
2.2.2 Isolierung und Vermehrung von Ektomykorrhiza (EM)-Pilzstämmen	19
2.2.3 Produktion des EM-Inokulums	21
2.2.4 <i>In-vivo</i> und <i>in-situ</i> Vermehrung des Rostpilzes <i>Melampsora larici-populina</i> (Mlp)	22
2.3 Feldversuche an den Standorten Gülzow (Deutschland) und Uppsala (Schweden)	23
2.3.1 Untersuchungsstandorte und Versuchsdesign	23
2.4 Chemische Analysen von Blatt- und Bodenproben	27
2.4.1 pH-Wert Bestimmung des Bodens	27
2.4.2 Bestimmung der Konzentration von Phenolen total und kondensierten Tanninen in Blättern	27
2.4.3 Extraktion der Salizylsäure aus Blattproben	28
2.4.4 Erfassung der Chlorophyllkonzentration in den Blattproben der Feldversuche	29
2.4.5 Analyse der C- und N- Konzentration der Blatt- und Bodenproben	29
2.4.6 Molekular-chemische Blattanalyse des Gefäßversuchs mittels Pyrolyse-Feldionisation Massenspektrometrie (Py-FIMS)	29

<b>2.5</b>	<b>Charakterisierung der EM in Gefäß- und Feldversuchen</b>	<b>30</b>
2.5.1	Bestimmung der EM-Rate	30
2.5.2	Morphologisch-anatomische Charakterisierung der EM-Pilze	31
<b>2.6</b>	<b>Molekularbiologische Methoden</b>	<b>32</b>
2.6.1	Extraktion pilzlicher DNA aus EM-Feinwurzeln	32
2.6.2	Amplifizierung der ITS- und LSU-Regionen der rDNA	33
2.6.3	Agarosegel-Elektrophorese	35
2.6.4	Aufreinigung der PCR-Produkte und Sequenzierung der ITS- und LSU-Regionen	36
2.6.5	Identifikation der EM-Pilze mittels BLAST	36
<b>2.7</b>	<b>Statistik</b>	<b>36</b>
2.7.1	Auswertung des Gefäßversuchs	36
2.7.2	Auswertung der Feldversuche in den KUPs Gülzow und Uppsala	37
<b>3.</b>	<b>ERGEBNISSE</b>	<b>38</b>
<b>3.1</b>	<b>Gefäßversuch</b>	<b>38</b>
3.1.1	EM-Rate und chemische Zusammensetzung von Blättern des Gefäßversuchs	38
3.1.2	Molekular-chemische Zusammensetzung der Pappelblätter des Gefäßversuchs	41
<b>3.2</b>	<b>Feldversuche an den Standorten Gülzow und Uppsala</b>	<b>46</b>
3.2.1	Chemische Zusammensetzung der Blätter von Pappel- und Weidenklonen	46
3.2.2	EM-Rate und EM-Diversität der Pappel- und Weidenklone in den KUPs Gülzow und Uppsala	48
3.2.3	Test auf Interaktion zwischen Rostpilzanfälligkeit und Blattchemie bzw. EM-Rate	57
<b>4.</b>	<b>DISKUSSION</b>	<b>61</b>
<b>4.1</b>	<b>Einzelne und interaktive Wirkung eines EM-Pilzes und eines Rostpilzisolates auf die Blattchemie eines Pappelklons im Modellversuch</b>	<b>61</b>
4.1.1	Effekte der Rostpilzinfektion auf den Primärmetabolismus	61
4.1.2	Effekte der Rostpilzinfektion auf den Sekundärmetabolismus	63
<b>4.2</b>	<b>Prüfung der Interaktion von Mykorrhizierung und Rostpilzanfälligkeit in der blattchemischen Qualität von <i>Salix</i>- und <i>Populus</i>-Klonen in Feldversuchen</b>	<b>66</b>
4.2.1	Klonspezifische EM-Diversität und Rostpilzanfälligkeit	67
4.2.2	Blattchemie mykorrhizierter Pappel- und Weidenklone und ihre partielle Beeinflussung durch Rostpilzinfektion	69
<b>4.3</b>	<b>Fazit</b>	<b>71</b>

## Inhaltsverzeichnis

<b>Zusammenfassung</b>	<b>73</b>
<b>Summary</b>	<b>76</b>
<b>Literaturverzeichnis</b>	<b>78</b>
<b>Anhang</b>	<b>88</b>
<b>Danksagung</b>	<b>i</b>
<b>Thesen der Dissertation</b>	<b>iii</b>

## Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1.1	Feinwurzel mit Ektomykorrhiza (EM)- (links) und vesikulär-arbuskulärer (VA) Besiedlung (rechts)	9
Abbildung 1.2	Schematische Darstellung des Entwicklungszyklus von <i>Melampsora</i> spp. am Beispiel von <i>Larix</i> spec. (Zwischenwirt) und <i>Populus</i> spec. (Hauptwirt)	12
Abbildung 1.3	<i>Melampsora</i> spp. Uredosporenlager und ihre Symptome an einem natürlichen Pappelhybriden ( <i>Populus trichocarpa</i> × <i>deltoides</i> 'Beaupré').	13
Abbildung 2.1	Anordnung der untersuchten Klone in der KUP Gülzow am Beispiel des Blocks A	24
Abbildung 2.2	Anordnung der Rostpilz-anfälligen und -resistenten <i>Salix viminalis</i> Klone in der KUP Uppsala, Schweden	26
Abbildung 2.3	Morphologie der Verzweigungstypen von Ektomykorrhizen nach dem online Programm DEEMY (2004, Agerer & Rambold)	32
Abbildung 2.4	Schematisch dargestellter Ausschnitt der ribosomalen DNA mit den ITS- und LSU-Regionen	33
Abbildung 3.1	Box Plots der Sprossbiomasse (A) und prozentualen EM-Besiedlung (B) der Feinwurzeln vier Monate alter Pappeln ( <i>P. trichocarpa</i> × <i>deltoides</i> 'Beaupré') mit unterschiedlichen Varianten	39
Abbildung 3.2	Score Plot der Hauptkomponenten 1 vs. 2 einer Diskriminanzanalyse basierend auf der molekular-chemischen Zusammensetzung der <i>Populus trichocarpa</i> × <i>deltoides</i> 'Beaupré' Blätter	43
Abbildung 3.3	Box Plots der relativen Häufigkeiten (prozentualer Anteil der totalen Ionenintensität, %TII) der Blattkomponenten mit den Masse/Ladung (m/z) Verhältnissen (A) 308, (B) 298, (C) 300, (D) 392, (E) 268 und (F) 270 der hochauflösenden Pyrolyse-Feldionisation Massenspektrometrie (Py-FIMS) in den Pappelblättern ( <i>Populus trichocarpa</i> × <i>deltoides</i> 'Beaupré') unterschiedlicher Varianten	45
Abbildung 3.4	Relative Häufigkeit der identifizierten EM-Morphotypen (% der untersuchten Feinwurzelspitzen) bei Pappel- und Weidenklonen der KUP Gülzow	53
Abbildung 3.5	Relative Häufigkeit der identifizierten EM-Morphotypen (% der untersuchten Feinwurzelspitzen) bei <i>S. viminalis</i> Klonen der KUP Uppsala, Schweden	56
Abbildung 3.6	Score Plot der Hauptkomponenten 1 vs. 2 einer PCA basierend auf den Pilzpartner-spezifischen EM-Raten der Pappel- und Weidenklone aus der KUP Gülzow sowie ihres Rostpilzbefalls (Boniturdaten Gülzow)	59
Abbildung 4.1	Schematische Auszüge der Verknüpfung von Primär- und Sekundärmetabolismus in Pappelblättern modifiziert nach Mellway et al. (2009)	65



## Tabellenverzeichnis

Tabelle 1.1	Rechtliche Rahmenbedingungen bei der Anlage von KUPs (modifiziert nach Marx, 2012)	4
Tabelle 2.1	Fundorte der Fruchtkörper von Ektomykorrhiza (EM)-Pilzen unter Pappeln ( <i>Populus</i> spp.) in der KUP Gülzow	20
Tabelle 2.2	Zusammensetzung der modifizierten Melin Norkrans-Nährlösung nach Kottke et al. (1987)	21
Tabelle 2.3	Komponenten der Spurenelementlösung des Melin Norkrans-Mediums	22
Tabelle 2.4	Klassifizierung der Pappel- ( <i>Populus</i> spp.) und Weidenklone ( <i>Salix</i> spp.) der LFA-Gülzow in Rostpilz-anfällige und Rostpilz-resistente Klone	25
Tabelle 2.5	Klassifizierung der <i>S. viminalis</i> Klone der KUP Uppsala, Schweden in Rostpilz-anfällige und -resistente Klone	27
Tabelle 2.6	Sequenzen der verwendeten Primer bei den PCR-Reaktionen	33
Tabelle 2.7	Spezifische Zusammensetzung der Reaktionskomponenten für die PCR der EM-Pilzproben aus Gülzow und Uppsala, Schweden	34
Tabelle 2.8	PCR-Programm nach Haug (2002) zur Amplifizierung der ITS 1- und 2-Regionen (Primer: ITS 1F, ITS 4) von den EM-Pilzproben aus Gülzow und Uppsala, Schweden	34
Tabelle 2.9	PCR-Programm nach Haug (2002) zur Amplifizierung der LSU-Region (Primer: NL-1, NL-4) von den EM-Pilzproben aus Gülzow und Uppsala, Schweden	35
Tabelle 3.1	Konzentration chemischer Komponenten in den Blättern vier Monate alter Pappeln ( <i>Populus trichocarpa</i> × <i>deltoides</i> 'Beaupré') mit unterschiedlichen Varianten	40
Tabelle 3.2	Effekte der EM-Besiedlung (EM), Rostpilzinfektion (R) sowie ihrer Interaktion (EM × R) auf die Konzentration der Phenole total, kondensierten Tannine, Salizylsäure und N bei vier Monate alten Pappelblättern ( <i>Populus trichocarpa</i> × <i>deltoides</i> 'Beaupré')	40
Tabelle 3.3	Flüchtige Bestandteile (VM, %), Gesamtionenintensität (TII) und Intensitäten wichtiger Stoffklassen ( $10^6$ Ionen pro mg Probe) in den Blättern von <i>Populus trichocarpa</i> × <i>deltoides</i> 'Beaupré' (4 Monate alt) mit unterschiedlichen Varianten	42
Tabelle 3.4	Elementare Zusammensetzung der am häufigsten diskriminierenden Masse/Ladung (m/z) Verhältnisse (aufgelistet in absteigender Reihenfolge) der hoch-auflösenden Py-FIMS Analysen und ihre Zuordnung zu einer molekularen Formel und ihren Stoffklassen	44
Tabelle 3.5	Konzentrationen chemischer Komponenten der Blätter von Pappel- und Weidenklone aus der KUP Gülzow	47
Tabelle 3.6	Konzentrationen chemischer Blattkomponenten in sechs <i>S. viminalis</i> Klonen aus einer KUP in Uppsala, Schweden	48

Tabelle 3.7	Beschreibung der EM-Morphotypen und ihrer identifizierten EM-Pilzpartner an Weiden- und Pappelklonen der KUP Gülzow	49
Tabelle 3.8	Gesamte EM-Raten (% der untersuchten Feinwurzelspitzen) und Pilzpartner-spezifische EM-Raten (% der untersuchten Feinwurzelspitzen) von Pappel- und Weidenklonen aus der KUP Gülzow	51
Tabelle 3.9	Beschreibung der EM-Morphotypen und ihrer identifizierten EM-Pilzpartner an den Feinwurzeln von <i>S. viminalis</i> Klonen der KUP Uppsala, Schweden	54
Tabelle 3.10	Gesamte EM-Raten (% der untersuchten Feinwurzelspitzen) und EM-Raten einzelner Pilzpartner (% der untersuchten Feinwurzelspitzen) von <i>S. viminalis</i> Klonen der KUP Uppsala, Schweden	55
Tabelle 3.11	Effekte der Rostpilzanfälligkeit (R), der Baumart (B) und ihrer Interaktion (R x B) auf die Konzentrationen der Salizylsäure, kondensierten Tannine und Chlorophyll total in den Blättern von Pappel- und Weidenklonen der KUP Gülzow	58
Tabelle 3.12	Effekte der Rostpilzanfälligkeit (R), der Baumart (B) und ihrer Interaktion (R x B) auf die gesamte EM-Besiedlung (EM total) und EM-Diversität der Pappel- und Weidenklone aus der KUP Gülzow	60

## Abkürzungsverzeichnis

Aqua <sub>dest</sub>	Destilliertes Wasser
Bp	Basenpaare
BGBI	Bundesgesetzblatt
BMEL	Bundesministerium für Ernährung und Landwirtschaft
BNatSchG	Bundesnaturschutzgesetz
BWaldG	Bundeswaldgesetz
C	Kohlenstoff
Chl	Chlorophyll
C <sub>org</sub>	Organischer Kohlenstoff
CT	Condensed tannins
cv.	cultivar
DMSO	Dimethylsulphoxid
DNA	Deoxyribonucleic acid
dNTP	Nukleosidtriphosphat
GAK	Gemeinschaftsaufgabe Agrarstruktur und Küstenschutz
E	Extinktion
e	Extinktionskoeffizient
eBA <sub>nz</sub>	Elektronischer Bundesanzeiger
EG	Europäische Gemeinschaft
ELER	Europäischer Landwirtschaftsfonds für die Entwicklung des ländlichen Raums
EM	Ektomykorrhiza/ektomykorrhiziert
EU	Europäische Union
FG	Fördergrundsätze
FoVG	Forstvermehrungsgutgesetz
FM	Frischmasse
hpi	hours post infection
HR	Hypersensitive Reaktion
IR	Induzierte Resistenz
ISR	Induzierte systemische Resistenz
ITS	internal transcribed spacer
K <sub>t</sub>	Kalium total
KUP	Kurzumtriebsplantage
LC-MS/MS	Flüssig-Chromatographie-Tandem-Massenspektrometrie
LFA	Landesforschungsanstalt für Landwirtschaft und Fischerei

## Abkürzungsverzeichnis

LNatSchG	Landesnatorschutzgesetz
LSU	large subunit
Mg <sub>t</sub>	Magnesium total
m/z	Masse/Ladung
MMN	modified Melin Norkrans
M-V	Mecklenburg-Vorpommern
N	Stickstoff
NCBI	National Center for Biotechnology Information
NM	nicht-ektomykorrhiziert
N <sub>t</sub>	Stickstoff total
PAL	Phenylalanin-Ammonium-Lyase
PCR	polymerase chain reaction
P <sub>t</sub>	Phosphor total
PDA	potato dextrose agar
PLANAK	Planungsausschuss für Agrarstruktur und Küstenschutz
Py-FIMS	Pyrolyse-Feldionisation Massenspektrometrie
rDNA	ribosomal deoxyribonucleic acid
RNA	Ribonucleic acid
RT	Raumtemperatur
S	Svedberg
SA	salicylic acid
SAR	systemisch erworbene Resistenz
spec.	species
spp.	species pluralis
SRC	short rotation coppice
TAE-Puffer	TRIS-Acetat-EDTA Puffer
TII	total ion intensity
TM	Trockenmasse
VA	Vesikulär-arbuskuläre Mykorrhiza
VM	volatile matter
VO	Verordnung
Vol.	Volumen

# 1. Einleitung

## 1.1 Kurzumtriebsplantagen zur Biomasseerzeugung

Kurzumtriebsplantagen (KUP) dienen dem Ziel in kurzer Umtriebszeit (= Zeit zwischen zwei Ernten, die dem Bestand für die Ertragsbildung zur Verfügung steht) nachwachsende Rohstoffe aus schnellwachsenden Baumarten anzuziehen. Abhängig von dem Verwendungszweck der Rohstoffe werden als Synonyme auch Energiewald, Energieplantage, Energieholzkultur und Short Rotation Coppice (SRC) verwendet. Auf zuvor intensiv genutzten Ackerflächen können KUPs Landschaften strukturell bereichern und positive ökologische Effekte hervorrufen wie z. B. eine Verbesserung des Mikroklimas, der Biodiversität sowie eine Zunahme des Humusgehaltes und eine Steigerung der Biomasse (Kröber et al. 2014). Besonders der Biomassezuwachs bietet eine zukünftige Möglichkeit die endlichen fossilen und atomaren Energieträger zu ersetzen und gleichzeitig die CO<sub>2</sub>-Emissionen durch Kohlenstoffbindung in der Humusschicht zu vermindern (Lockwell et al. 2012; Dillen et al. 2013). Kahle & Boelcke (2004) gehen davon aus, dass innerhalb von sechs Jahren von einer signifikanten Erhöhung der C-Gehalte von 30 - 40% im Oberboden ausgegangen werden kann.

Ein weiterer Vorteil, der die Nachhaltigkeit der Biomasseproduktion in KUPs unterstreicht, ist die Fähigkeit von Pappeln und Weiden Luft-N fixieren und im oberirdischen Holzzuwachs speichern zu können. Der N-Austrag findet über die Ernte statt, so dass die N-Last der Böden oder des Grundwassers nicht erhöht wird (von Wülisch 2012). Der Verzicht von Düngemitteln und Pestiziden auf KUPs zeigt sich ebenfalls als vorteilhaft für den Boden, da Nährstoffüberschüsse wie z. B. N abgebaut und Lachgasemissionen (N<sub>2</sub>O) auf ein Minimum reduziert werden (Hauk et al. 2014). Auch wird hierdurch der Eintrag in angrenzende Gewässer herabgesetzt, was die Gefahr der Eutrophierung im Vergleich zu konventioneller Ackernutzung verringert (Dimitriou et al. 2012).

Die Bodenbearbeitung auf KUPs ist nur bei Erstbepflanzung erforderlich. Danach bleibt die Bodenstruktur bis zu 20 Jahren ungestört, wodurch die Puffer- und Filtermechanismen des Bodens gestärkt werden und seine Verdichtung herabgesetzt wird (BUND 2010). Bodenphysikalisch zeigen Böden unter Pappeln und Weiden signifikant verringerte Rohdichten und einen erhöhten Anteil an Mittelporen, wodurch der Wasserrückhalt im Oberboden verbessert ist (Kahle & Boelcke 2004). Durch die relativ starke Durchwurzelung auf der KUP wird der Erosionsschutz erhöht. Zusätzlich trägt diese zur Lockerung des Oberbodens bei und kann somit bestehende Verdichtungshorizonte aufbrechen (BUND 2010).

Bei der Bewirtschaftung von KUPs gilt grundsätzlich, dass nach einmalig erfolgter Kulturbegründung (Stecklingspflanzung) die Sprossmasse nach drei bis zehn Jahren (max. 20 Jahre) geerntet wird. Um hohe Erträge erzielen zu können werden Pappel- oder Weidenstecklinge möglichst dicht gepflanzt (2000 - 17.800 Stecklinge/ha). Auf guten Standorten mit lehmigen Sanden bis tonigen Lehmen (pH 5,5 - 6,5) und Umtriebszeiten von fünf Jahren (lt. Definition) sollten schnellwachsende Baumarten mind. 10 t/ha Trockenmasse jährlich bilden können (Boelcke 2006). Nach Angaben der Fachagentur für nachwachsende Rohstoffe (Schütte (FNR) 2012) liegen die Erträge in der Praxis in Mecklenburg-Vorpommern (M-V) für Weiden bei 5 - 10 t/ha und für Pappeln bei 10 - 15 t/ha und werden als Holzhackschnitzel, Scheitholz oder Holzpellets zur Wärmergewinnung eingesetzt. Auf rund 50.000 ha wurden europaweit Energiepflanzen zur Bioenergieproduktion in KUPs angebaut (Don et al. 2012). In den Jahren 2012/13 betrug die Anbaufläche von Energiepflanzen als Festbrennstoffe in Deutschland 11.000 ha (FNR 2013), wobei der Anbau in Form von KUPs – vorwiegend mit Pappeln bepflanzt – bei ca. 4100 ha liegt (Schütte 2012). Im Hinblick auf andere EU-Länder liegen die Anbauflächen bspw. in Schweden bei 16.000 ha, die vom Weidenanbau dominiert werden, in Polen bei 7000 ha und in Italien 6000 ha (Wickham et al. 2010; BUND 2010). Der BUND (2010) geht davon aus, dass die geringe KUP-Anbaufläche im Kontext der zunehmenden Flächenkonkurrenz um landwirtschaftlich genutzte Flächen zu sehen ist und andere landwirtschaftliche Kulturen höhere Erlöse erwirtschaften können. Eine verlässliche Prognose über den Umfang, in dem zukünftig schnellwachsende Hölzer angebaut werden, kann noch nicht erstellt werden.

Seit 1976 werden Pappeln (*Populus* spp.) und Weiden (*Salix* spp.) in Deutschland angebaut; Forschungsvorhaben werden erst seit 1982 durch die Bundesregierung gefördert (von Wühlisch 2000). Grundsätzlich können Grünlandflächen zur Anlage von KUPs unter Berücksichtigung von § 5 BNatSchG „Land-, Forst- und Fischereiwirtschaft“<sup>1</sup> und § 30 BNatSchG „Gesetzlich geschützte Biotope“<sup>1</sup> sowie § 14 LNatSchG „Schutz bestimmter Teile von Natur und Landschaft (zu den §§ 20 bis 36 BNatSchG)“<sup>2</sup> genutzt werden (weitere Bedingungen siehe Tab. 1.1). Das Waldgesetz ist hiervon ausgenommen. Mit der Novellierung des Bundeswaldgesetzes (BWaldG) im Jahre 2010 wurde festgelegt, dass KUPs „(K)kein Wald im Sinne dieses Gesetzes [...]“ (§ 2 Abs. 2 BWaldG<sup>3</sup>) sind und somit nicht dem Forstrecht unterliegen. KUPs – i.S. des Niederwalds (= Wald aus Stockausschlag)

<sup>1</sup> Bundesnaturschutzgesetz vom 29. Juli 2009 (BGBl. I S. 2542), das zuletzt durch Artikel 4 Absatz 100 des Gesetzes vom 7. August 2013 (BGBl. I S. 3154) geändert worden ist

<sup>2</sup> Gesetz des Landes Mecklenburg-Vorpommern zur Ausführung des Bundesnaturschutzgesetzes (Naturschutzausführungsgesetz – NatSchAG M-V) vom 23. Februar 2010 verkündet als Artikel 1 des Gesetzes zur Bereinigung des Landesnaturschutzrechts vom 23. Februar 2010 (GVBl. M-V S. 66)

<sup>3</sup> Bundeswaldgesetz vom 2. Mai 1975 (BGBl. I S. 1037), das zuletzt durch Artikel 1 des Gesetzes vom 31. Juli 2010 (BGBl. I S. 1050) geändert worden ist

im Kurzumtrieb – gelten auf EU-Ebene seit 2009 als Dauerkulturen (VO (EG) 1120/2009 Art. 2 b) und sind beihilfefähige landwirtschaftliche Flächen (VO (EG) 73/2009 Art. 34 Abs. 2), wenn der max. Erntezyklus der darauf angebauten Gehölzarten 20 Jahre nicht überschreitet (eBAnz AT51 2010 V1, eBAnz AT 52 2010 B1).

Vor der Novellierung wurden KUPs gemäß dem "Gesetz zur Gleichstellung stillgelegter und landwirtschaftlich genutzter Flächen vom 10. Juli 1995 (BGBl. I S. 910), das zuletzt durch Artikel 26 des Gesetzes vom 9. Dezember 2010 (BGBl. I S. 193) geändert worden ist" angelegt. Nach § 1 Abs. 1 und 3 gelten hiernach auch als stillgelegte Flächen, diejenigen die „[...] 1. für den Anbau von Kurzumtriebswäldern genutzt oder 2. nicht mehr für die Erzeugung genutzt werden, [...]“. „[...] das Recht, diese Flächen nach Beendigung der Stilllegungsperiode in derselben Art und demselben Umfang wie zum Zeitpunkt vor der Stilllegung nutzen zu können, unberührt.“ Eine Zusammenfassung der rechtlichen Rahmenbedingungen bei der Anlage von KUPs findet sich in Tabelle 1.1.

**Tabelle 1.1:** Rechtliche Rahmenbedingungen bei der Anlage von KUPs (modifiziert nach Marx 2012).

EU-Ebene
<i><b>Beihilfefähigkeit und Cross-Compliance</b></i>
<p><b>VERORDNUNG (EG) Nr. 73/2009 DES RATES</b>  vom 19. Januar 2009 mit gemeinsamen Regeln für Direktzahlungen im Rahmen der gemeinsamen Agrarpolitik und mit bestimmten Stützungsregelungen für Inhaber landwirtschaftlicher Betriebe und zur Änderung der Verordnungen (EG) Nr. 1290/2005, (EG) Nr. 247/2006, (EG) Nr. 378/2007 sowie zur Aufhebung der Verordnung (EG) Nr. 1782/2003</p>
<p><b>VERORDNUNG (EG) Nr. 1120/2009 DER KOMMISSION</b>  vom 29. Oktober 2009 mit Durchführungsbestimmungen zur Betriebsprämienregelung gemäß Titel III der Verordnung (EG) Nr. 73/2009 des Rates mit gemeinsamen Regeln für Direktzahlungen im Rahmen der gemeinsamen Agrarpolitik und mit bestimmten Stützungsregelungen für Inhaber landwirtschaftlicher Betriebe</p>
<p><b>VERORDNUNG (EG) Nr. 1122/2009 DER KOMMISSION</b>  mit Durchführungsbestimmungen zur Verordnung (EG) Nr. 73/2009 des Rates hinsichtlich der Einhaltung anderweitiger Verpflichtungen, der Modulation und des integrierten Verwaltungs- und Kontrollsystems im Rahmen der Stützungsregelungen für Inhaber landwirtschaftlicher Betriebe gemäß der genannten Verordnung und mit Durchführungsbestimmungen zur Verordnung (EG) Nr. 1234/2007 hinsichtlich der Einhaltung anderweitiger Verpflichtungen im Rahmen der Stützungsregelung für den Weinsektor</p>
Bundesebene
<i><b>Bundeswaldgesetz</b></i>
<p><b>BUNDESWALDGESETZ</b> vom 2. Mai 1975 (BGBl. I S. 1037), das zuletzt durch Artikel 1 des Gesetzes vom 31. Juli 2010 (BGBl. I S. 1050) geändert worden ist</p>
<i><b>Gesetz über Naturschutz und Landschaftspflege (Bundesnaturschutzgesetz)</b></i>
<p><b>BUNDESNATURSCHUTZGESETZ</b> vom 29. Juli 2009 (BGBl. I S. 2542), das zuletzt durch Artikel 4 Absatz 100 des Gesetzes vom 7. August 2013 (BGBl. I S. 3154) geändert worden ist</p>
<i><b>Forstvermehrungsgutgesetz</b></i>
<p><b>FORSTVERMEHRUNGSGUTGESETZ</b> vom 22. Mai 2002 (BGBl. I S. 1658), das zuletzt durch Artikel 37 des Gesetzes vom 9. Dezember 2010 (BGBl. I S. 1934) geändert worden ist</p>
<i><b>Biokraftstoff-Nachhaltigkeitsverordnung</b></i>
<p><b>BIOKRAFTSTOFF-NACHHALTIGKEITSVERORDNUNG</b> vom 30. September 2009 (BGBl. I S. 3182), die zuletzt durch Artikel 2 der Verordnung vom 26. November 2012 (BGBl. I S. 2363) geändert worden ist</p>
<i><b>Erneuerbare-Energien-Gesetz</b></i>
<p><b>ERNEUERBARE-ENERGIEN-GESETZ</b> vom 25. Oktober 2008 (BGBl. I S. 2074), das zuletzt durch Artikel 5 des Gesetzes vom 20. Dezember 2012 (BGBl. I S. 2730) geändert worden ist</p>

Auf Grundlage des Gesetzes über die Gemeinschaftsaufgabe „Verbesserung der Agrarstruktur und des Küstenschutzes“ (GAK-Gesetz), das in der Fassung vom 21. Juli 1988



(BGBl. I S. 1055) bekanntgegeben wurde und zuletzt durch das Gesetz vom 09.12.2010 (BGBl. 2010 Teil I Nr. 63 S. 1934) geändert worden ist, wurde vom Planungsausschuss für Agrarstruktur und Küstenschutz (PLANAK) ein Rahmenplan zur Verbesserung der Agrarstruktur und des Küstenschutzes für den Zeitraum 2014 bis 2017 festgelegt (2014 BMEL). Danach sollen u. a. Investitionen zur Schaffung zusätzlicher Einkommensquellen im ländlichen Raum, die die Bedingungen der ELER<sup>4</sup>-Verordnung und der De-minimis-Beihilfe<sup>5</sup> erfüllen, gefördert werden. KUPs werden zu dieser Definition gezählt und können unter Erfüllung einer Flächenobergrenze von je 10 ha, einer Mindestbaumzahl von 3000 Bäumen/ha sowie einer Mindestlaufzeit von 12 Jahren subventioniert werden. Laut FNR<sup>6</sup> (Stand 2011/2012) wurde diese Förderung in M-V noch nicht in Anspruch genommen.

## 1.2 Pappel- und Weidenklone für die Kurzumtriebswirtschaft

Bei der Arten- und Sortenwahl von Gehölzen muss u. a. das Forstvermehrungsgutgesetz (FoVG)<sup>7</sup> beachtet werden. In diesem Gesetz ist geregelt, dass unter Vermehrungsgut Pflanzenteile und Pflanzgut zu verstehen ist, welches für forstliche Zwecke bestimmt ist. Pflanzenteile wiederum bezeichnen Ableger, Steckhölzer, Setzstangen und andere Teile von Pflanzen außer Saatgut, die zur Auspflanzung oder zur Erzeugung von Pflanzgut verwendet werden. Pflanzgut ist aus Saatgut oder Pflanzenteilen angezogene oder aus Naturverjüngung gewonnene Pflanzen. Steckhölzer und Setzstangen, können im hof- bzw. betriebseigenen Mutterquartier vorgezogen werden, wenn sie ausschließlich im eigenen Betrieb verwendet und nicht in den Verkehr gebracht werden. Das erste Ausgangsmaterial für das Mutterquartier muss jedoch den Bestimmungen für forstliches Vermehrungsgut gemäß FoVG entsprechen (Boelcke 2006).

Für den Kurzumtrieb wurden Baumarten wie Weiden (*Salix*), Pappeln (*Populus*), Robinien (*Robinia*), Birken (*Betula*), Erlen (*Alnus*), die Gemeine Esche (*Fraxinus excelsior*) sowie Stiel- (*Quercus robur*), Trauben- (*Quercus petraea*) und Roteiche (*Quercus rubra*) mit einem max. Erntezyklus von 20 Jahren zugelassen (eBAnz AT51 2010 V1, eBAnz AT 52 2010 B1)

---

<sup>4</sup> Europäischer Landwirtschaftsfonds für die Entwicklung des ländlichen Raums = ELER

<sup>5</sup> „Im Rahmen des Förderprogramms „De-minimis“ werden Unternehmen des Güterkraftverkehrs gefördert, die bestimmte Maßnahmen zur Erhöhung der Sicherheit oder zum Schutz der Umwelt durchführen.“ Nach Bundesamt für Güterverkehr (BAG): Förderprogramm „De-minimis“, abrufbar unter [http://www.bag.bund.de/DE/Navigation/Foerderprogramme/Deminimis/deminimis\\_node.html](http://www.bag.bund.de/DE/Navigation/Foerderprogramme/Deminimis/deminimis_node.html) [letzter Zugriff: 15.12.2014]

<sup>6</sup> Fachagentur nachwachsende Rohstoffe (FNR). Förderung von Kurzumtriebsplantage in den Bundesländern (Stand: 2011/2012), abrufbar unter <http://energiepflanzen.fnr.de/pflanzen/mehrjaehrige/energieholz/kup-foerderung/> [letzter Zugriff: 15.12.2014]

<sup>7</sup> Forstvermehrungsgutgesetz vom 22. Mai 2002 (BGBl. I S. 1658), das zuletzt durch Artikel 37 des Gesetzes vom 9. Dezember 2010 (BGBl. I S. 1934) geändert worden ist

und fallen mit Ausnahme der Weiden unter das FoVG. Im Allgemeinen sollten Baumarten und Sorten im Kurzumtrieb folgende Eigenschaften mitbringen (Boelcke 2006):

- 1) Raschwüchsigkeit in der Jugendphase
- 2) Vermehrbarkeit über Steckholz (entscheidender Kostenvorteil)
- 3) Sicheres Anwuchsverhalten
- 4) Hohes und nachhaltiges Stockausschlagsvermögen
- 5) Konkurrenzverträglichkeit im Dichtstand
- 6) Früh- und Spätfrostresistenz und Resistenz gegenüber biotischen Schäden

In unserem Klimabereich können leistungsstarke Pappel- und Weidenklone (*Populus* und *Salix* spp.) eine hohe Biomasseproduktion von bis zu 20 t/ha/a erreichen. Sie zeichnen sich weiterhin durch eine leichte Vermehrbarkeit, ein gutes Stockausschlagsvermögen und eine hohe Dichtstandverträglichkeit aus (Bradshaw et al. 2000). Bei Pappeln werden in Deutschland im Kurzumtrieb vorwiegend Europäische Schwarzpappeln (*P. nigra* L.; Sektion *Aigeros*) und Amerikanische Pappeln (*P. deltoides* Marsh; Sektion *Aigeros*) sowie Amerikanische Balsampappeln (*P. trichocarpa* Torr. & Gray; Sektion *Tacamahaca*) und Artenhybride wie *P. × euramericana* (Dode) Guinier (Syn. *P. × canadensis* Moench) und intersektionelle Hybriden wie z. B. *P. × interamericana* Brockh. (Syn. *P. × generosa* Henry) angepflanzt (Boelcke 2006; Pinon et al. 2006). Diese weisen geringe Ansprüche an Wärme, Bodendurchlüftung sowie Raschwüchsigkeit aus. Reine Schwarzpappeln stellen hohe Anforderungen und Aspen (Sektion *Leuce*) sind durch ihre Wurzelbrutbildung (= Pflanzentriebe, die aus oberflächlich wachsenden Wurzeln der Mutterpflanzen erwachsen) nach dem Rückschnitt nicht für den Kurzumtrieb geeignet. Robinien, Erlen und Birken sind auf Grund ihrer spezifischen Standortansprüche und ihres geringen Ertragsvermögens ebenfalls nicht zum Anbau im Kurzumtrieb empfohlen (Boelcke 2006).

Die Zulassung von Pflanzgut für den Kurzumtrieb erfolgt auf der Grundlage langjähriger Prüfanbauten nach Vorgaben des Gesetzes über forstliches Saat- und Pflanzgut und den hierzu ergangenen Rechts- und Verwaltungsvorschriften in der Kategorie „Geprüftes Vermehrungsgut“. Zugelassene Klone und Klonmischungen der Pappel werden in das Baumzuchtregister des Regierungspräsidiums Kassel eingetragen (von Wühlisch 2012). Da Weiden nicht unter das FoVG fallen, ist eine Sortenprüfung daher auch nicht vorgeschrieben. Die Identifizierung von Pappelklonen wird auf Basis morphologischer und phänologischer Merkmale durchgeführt. Allerdings reicht dieses Verfahren bei Klonmischungen nicht mehr aus, da natürliche Hybriden vorkommen wie z. B. bei der Kanadischen Schwarzpappel (*P. deltoides* Bartr.) und der Europäischen Schwarzpappel (*P. nigra* L.), deren Nachkommenschaft als *Populus × euramericana* bezeichnet wird; daher werden auch biochemische Methoden zur Identifikation herangezogen. Um die forstgenetischen Ressourcen

zu erhalten wurde das EU-Programm EUFORGEN eingerichtet, bei dem Deutschland seit 1998 involviert ist (von Wühlisch 2000).

Die exakte Bestimmung einzelner Weidenindividuen auf Grund von morphologischen und phänologischen Merkmalen z. T. kombiniert mit vegetationsökologischer Charakterisierung erweist sich in der Praxis schwieriger als bei Pappeln und ist in einigen Fällen nicht immer möglich. Daher ist eine Ergänzung mit biochemischen und genetischen Analysen zur Artdifferenzierung über den Vergleich von nahe verwandten Arten bzw. Unterarten innerhalb einer Sektion sinnvoll (Lin et al. 1994; Holdenrieder et al. 1999).

Die Gattung *Populus* umfasst über 74 Arten, welche in sechs Sektionen eingeteilt sind (Lin et al. 2006). Diese erstrecken sich von der subtropischen Zone über die gemäßigten bis hin zu den borealen Zonen der Nordhemisphäre (Hamzeh & Dayanandan 2004). Sektionen dienen der Strukturierung vieler Arten innerhalb einer Gattung; sie entsprechen aber keiner taxonomischen Klassifikation:

- 1) *Aigeros*
- 2) *Leuce*
- 3) *Leucoides*
- 4) *Tacamahaca*
- 5) *Abaso*
- 6) *Turanga*

Pappeln sind auf Grund eines schnellen Wachstums, einer hohen sexuellen Reproduktionsrate, einer einfachen Klonierung sowie eines kleinen Genoms, einer einfachen Transgenese und einer engen Kopplung zwischen physiologischen Merkmalen und Biomasseproduktion geeignet Modellpflanzen für genetische und ökophysiologische Untersuchungen zu sein (Bradshaw et al. 2000).

Die ca. 350 Arten der Gattung *Salix* sind überwiegend in den gemäßigten und kalten Zonen der Nordhemisphäre verbreitet (Holdenrieder et al. 1999). Zinovjev & Kadis (2007 - 2010) teilen die Weidenarten in 18 Sektionen ein:

- |  |                        |                                     |
|--|------------------------|-------------------------------------|
| 1) <i>Humboldtianae</i>                  | 7) <i>Myrtilloides</i> | 13) <i>Viminella</i> = <i>Vimen</i> |
| 2) <i>Triandrae</i>                      | 8) <i>Hastatae</i>     | 14) <i>Canae</i>                    |
| 3) <i>Salicaster</i> = <i>Pentandrae</i> | 9) <i>Cordatae</i>     | 15) <i>Geyerianae</i>               |
| 4) <i>Salix</i>                          | 10) <i>Cinerella</i>   | 16) <i>Griseae</i>                  |
| 5) <i>Subalbae</i>                       | 11) <i>Fulvae</i>      | 17) <i>Daphnella</i>                |
| 6) <i>Longifoliae</i>                    | 12) <i>Candidae</i>    | 18) <i>Helix</i>                    |

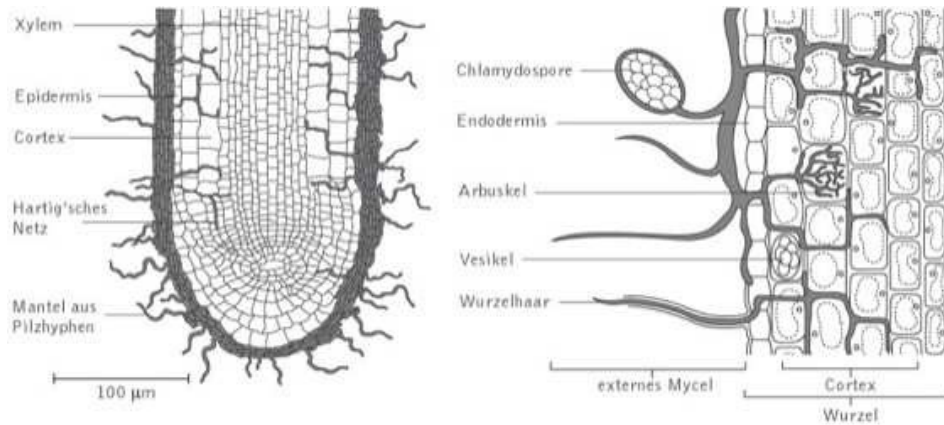
Weiden zeichnen sich vor allem durch ihre Fähigkeit aus, extreme Wasserschwankungen, freigelegte Wurzeln, Sedimentablagerungen oder lange Überschwemmungsperioden zu überleben. Hinzu kommt, dass sie die jährlich produzierten Samen effektiv über weite Distanzen verbreiten können, was ihre Ansiedlung sehr vereinfacht (Kuzovkina et al. 2008).

### **1.3 Ektomykorrhizierung und ihr Einfluss auf die blattchemische Zusammensetzung der Wirtspflanze**

Salicaceae gehören zu den dual mykorrhizierten Pflanzenfamilien, die sowohl arbuskuläre Mykorrhizierung als auch Ektomykorrhizierung (EM) ausbilden können (Wang & Qiu 2006). EM wurde überwiegend als die dominierende Mykorrhizierungsform der Salicaceae beschrieben (Baum et al. 2009); daher wurde die EM auch schwerpunktmäßig in dieser Arbeit untersucht. Die Diversität der EM formenden Pilztaxa wird auf 5000 - 6000 Arten geschätzt, welche aus den Abteilungen Basidiomycota (z. B. Vertreter der Boletaceae, Corticiaceae, Cortinariaceae, Tricholomataceae, Russulaceae, Thelephoraceae), Ascomycota (z. B. Vertreter der Elaphomycetaceae, Geneaceae) und Zygomycota stammen (Molina et al. 1992 zitiert in Nehls et al. 2007). Als Destruenten spielen Basidiomycota eine zentrale Rolle im globalen Kohlenstoffkreislauf, da sie Lignin-degradierende Enzyme produzieren um Holz abbauen zu können; hierfür investieren Basidiomycota viel Energie (Floudas et al. 2012). Ascomycota verfolgen eine eher opportunistische Strategie, die ihnen eine bessere Ressourcennutzung zur Reproduktion ermöglicht. Sie leben vorwiegend terrestrisch als Saprobionten oder Pflanzenpathogene; einige von ihnen sind in der Lage Lignin zu modifizieren (Worrall et al. 1997).

Die Etablierung der EM hängt von der Pflanzenart, dem Bodentyp und dem Mykorrhizapilz selbst ab, wohingegen der EM-Effekt stark durch die Bodenbearbeitung und natürliche Ereignisse im Ökosystem wie jahreszeitliche Klimaschwankungen beeinflusst wird (Hryniewicz et al. 2008). In natürlichen Weidenbeständen waren die EM-Rate und -Diversität im Vergleich zu einer benachbarten KUP, die intensiv zur Biomasseproduktion genutzt wird, erhöht (Hryniewicz et al. 2012). Die ökologischen Auswirkungen von EM auf Pflanzen konnten als positiv durch besseres Wachstum z. B. von Kiefernsetzlingen nachgewiesen werden (Oliveira et al. 2012). EM führt zur Ausbildung von interzellulären Hyphen zwischen den Rindenzellen der Feinwurzeln, dem sogenannten Hartig'schen Netz, jedoch nicht zu intrazellulärer pilzlicher Besiedlung wie im Falle von arbuskulärer Mykorrhizierung (Abb. 1.1). Im Boden breitet sich das extramatrikale Myzel der EM aus, um den Einzugsbereich für Nährstoffe (insbesondere N, P) und Wasser zu erweitern. Die Symbiose mit EM-Pilzen führt daher meist zu einer verbesserten Nährstoff- und

Wasserversorgung der Wirtspflanze sowie durch den äußeren Hyphenmantel zu einem mechanischen und biochemischen Schutz gegenüber bodenbürtigen Pathogenen (Smith & Read 2008; Lehto & Zwiazek 2011).



**Abbildung 1.1:** Feinwurzel mit Ektomykorrhiza (EM)- (links) und vesikulär-arbuskulärer (VA) Besiedlung (rechts). Bei der EM bildet sich um die Wurzelspitze ein dichter Mantel aus Pilzhypen, die sich interzellulär im Cortex ausbreiten (Hartig'sches Netz). Das äußere Myzel der VA kann sich in die Rhizosphäre ausbreiten und bildet Chlamydosporen aus. Die intrazelluläre Ausbildung der Vesikel und Arbuskel findet im Cortex statt (Quelle: <http://www.wissenschaft-online.de/abo/lexikon/biok/7904>).

EM-Pilze werden durch ihre Wirtspflanzen mit Assimilaten versorgt, wodurch sie eine große C sink darstellen. Im Vergleich zur Wurzelausscheidung, die 2 - 4% des durch die Nettophotosynthese fixierten C ausmacht (Day et al. 2010), werden bis zu 30% des fixierten C in Form von Assimilaten zu den assoziierten Pilzpartnern transportiert (Ek 1997). In Konsequenz des erhöhten Assimilatbedarfes bei Ausbildung von Mykorrhizierung steigert die Wirtspflanze ihre Photosyntheseleistung. Der Stoffaustausch von Pilz zu Wirtspflanze und von Wirtspflanze zu Pilz kann von beiden Partnern reguliert werden, um einem einseitigen Nutzen von Nährstoffen vorzubeugen. Mykorrhizierung kann jedoch grundsätzlich auch Phasen von Parasitismus umfassen (Nehls et al. 2007). Die Mykorrhizierung hat neben ihrem Einfluss auf die Photosyntheseleistung auch Auswirkungen auf die blattchemische Zusammensetzung der Wirtspflanze. So wurde eine Konzentrationsänderung von phenolischen Verbindungen in den Blättern verschiedener Weidenarten in Symbiose mit EM-Pilzen nachgewiesen (Baum et al. 2009).

## 1.4 Pathogene, Fraßschädlinge und Pflanzenschutzmaßnahmen an *Populus* und *Salix* spp.

### 1.4.1 Allgemeine Gefährdung und Schutzmaßnahmen

Aufgrund der üblichen Klonpflanzungen von *Populus* spp. und *Salix* spp. für den Kurzumtrieb über Stecklinge ist die Gefährdung einer schnellen und großflächigen Ausbreitung von Pathogenen in den Beständen besonders hoch. Dieser Tatsache wird weitgehend durch die Resistenzzüchtung sowie dem Anbau von mehreren Klonen pro Bestand Rechenschaft getragen. Auf chemischen Pflanzenschutz sowie auf Düngung wird im kommerziellen Anbau weitestgehend verzichtet. Zu den Pathogenen, die den größten ökonomischen Schaden in KUPs bewirken, zählen in erster Linie Rostpilze (*Melampsora* spp.). Diese können neben der Blatinfektion auch eine Stamminfektion<sup>8</sup> auslösen. Die Mehrzahl der aktuell im Anbau befindlichen Klone wurde auf eine hohe Resistenz gegenüber Rostpilzbefall selektiert. Bei nicht-resistenten Pflanzen bewirkt die Rostpilzinfektion eine verringerte Photosyntheseleistung, einen verfrühten Blattabfall und eine verringerte Vitalität. Eine weitere wirtschaftlich bedeutende Pilzkrankheit von *Populus* und *Salix* spp. ist die sog. Triebspitzenkrankheit, die durch *Pollacia* spp. verursacht wird und durch ein regenreiches Frühjahr gefördert werden kann. An Blättern und Triebspitzen kommt es nach der Infektion zu schwarzen Verfärbungen; die Verkrümmung der Triebspitzen sowie das Absterben der Triebe können folgen.

Fraßschäden treten an den Beständen sowohl durch Wildverbiss als auch durch herbivore Insekten auf. Wildverbiss kann durch einfache Maßnahmen wie Einzäunen mit einem Wildzaun eingedämmt werden. Bei den Insekten sind besonders der Große und Kleine Pappelblattkäfer (*Chrysomela populi* und *C. tremulae*), der Weidenblattkäfer (*Phratora vulgatissima*), die Gallmücken aus der Familie der Cecidomyiidae, die Blattwespe (*Nematus papillosus*), der Große und Kleine Pappelbock (*Saperda carcharias* und *populnea*) und die Aphiden (*Chaitophorus* spp. und andere Gattungen) zu nennen, die im Fall von Kalamitäten mit Insektiziden oder natürlichen Schadfeinden bekämpft werden können (Boelcke 2006; Landgraf & Helbig 2010; Georgi et al. 2013; Helbig et al. 2013).

### 1.4.2 Rostpilze (*Melampsora* spp.)

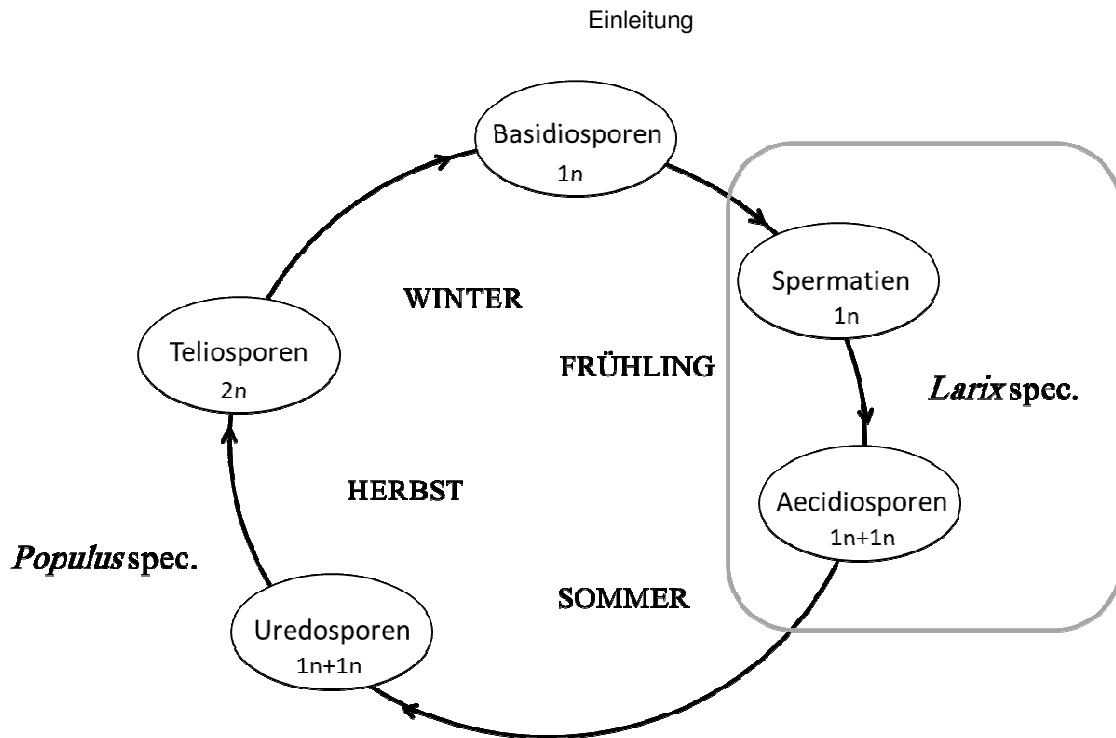
Rostpilze gehören zu den Basidiomyceten (Ordnung Uredinales) und stellen mit mehr als 7000 Arten eine der größten Gruppe von Pilzpathogenen dar. Blattrostpilze der Gattung *Melampsora* zählen zu den wichtigsten Krankheitserregern bei Weiden und Pappeln (Steenackers et al. 1996). Sie enthalten 80 - 100 verschiedene Arten, von denen mehr als

<sup>8</sup> z. B. von *M. ribesii-viminalis* Kleb. an *S. viminalis* ausgelöst (Pei 2005)

die Hälfte Salicaceae als Wirtspflanzen nutzt (Ciszewska-Marciniak & Jędryczka 2011; siehe Anhang A1). Rostpilzsporen können durch Regen und Wind über mehrere tausend Kilometer transportiert werden, um neue Infektionen auszulösen (Gérard et al. 2006).

Auf Grund der obligat biotrophen Lebensweise findet der gesamte Lebenszyklus der Rostpilze im lebenden Pflanzengewebe statt, welcher sich bei Rostpilzen der Gattung *Melampsora* in fünf Sporenstadien mit Wirts- und Kernphasenwechsel gliedert (Ciszewska-Marciniak & Jędryczka 2011) (Abb. 1.2).

Nach erfolgreicher Infektion des Zwischenwirts (hier: Lärche, *Larix* sp.) durch Basidiosporen (Frühling) reproduzieren sich diese und werden als Spermatien bezeichnet. Aus der darauffolgenden Fertilisation mit empfänglichen Hyphen resultieren rekombinante Aecidiosporen, welche im Frühsommer auf der Blattunterseite (abaxial) des Hauptwirts (hier: Pappel/Weide) Infektionen auslösen und weitere Aecidiosporen oder Uredosporen (Herbst) bilden können (Pei et al. 1996). Als Dauersporen entwickeln sich zum Winter hin Teliosporen, die auf abgefallenen Blättern überwintern und im darauffolgenden Frühjahr zu keimen beginnen um den Lebenszyklus mit der Bildung von Basidiosporen fortzusetzen (Ciszewska-Marciniak & Jędryczka 2011).



**Abbildung 1.2:** Schematische Darstellung des Entwicklungszyklus von *Melampsora* spp. am Beispiel von *Larix spec.* (Zwischenwirt) und *Populus spec.* (Hauptwirt). Der Entwicklungszyklus beinhaltet fünf Sporenstadien, die einen Kernphasenwechsel durchlaufen: Basidiosporen ( $1n$ ), Spermatien ( $1n$ ), Aecidiosporen ( $1n+1n$ ), Uredosporen ( $1n+1n$ ) und Teliosporen ( $2n$ ) als Überwinterungsspore.

Die Sporeninfektion der Uredosporen erfolgt im Blatt in drei Schritten: die Penetration durch die geöffneten Stomata (abaxial), das parasitische Wachstum, das die Bildung von Haustorien und das Myzelwachstum im Schwamm- und z. T. auch Palisadenparenchym beinhaltet sowie die Sporulation, die mit dem Durchbrechen der Uredosporenlager auf der abaxialen Blattseite und dem darauffolgenden Freilassen der Sporen den Infektionsprozess abschließt (Johnson & Kim 2005; Rinaldi et al. 2007) (Abb. 1.3).

Durch die Ausbildung des Haustoriums wird bei kompatiblen Wirt-Pathogen Interaktionen die Wirtsabwehr unterdrückt und der Wirtsmetabolismus – besonders der Kohlenhydratmetabolismus – auf die Bedürfnisse des Pilzes angepasst, d. h. das Haustorium dient als C sink. Als Konsequenz erfolgt ein erhöhter C-Transport aus nicht-infiziertem (*source*) in infiziertes Wirtsgewebe. Ein erhöhter C-Bedarf zieht wiederum eine gesteigerte Photosyntheseaktivität sowie einen erhöhten Energiebedarf nach sich (Bolton 2009; Major et al. 2010). Da jedoch die starke Myzelvermehrung im Blatt und die großflächige Ausbreitung der Uredosporenlager auf der Blattoberfläche die Wirtsphotosynthese stark beeinträchtigt ist, kann dieser erhöhte Energiebedarf nicht gedeckt werden, was zu einer Schwächung der betroffenen Gewebebereiche führt. Zusammen mit einer hypersensitiven Reaktion als verspätete Wirtsabwehr (siehe Kapitel 1.5) kommt es zum Zelltod bis hin zum Blattabwurf, so dass die Pflanze bei hohem, verfrühtem Biomasseverlust insgesamt geschwächt wird (Laurans & Pilate 1999).





**Abbildung 1.3:** *Melampsora* spec. Uredosporenlager und ihre Symptome an einem natürlichen Pappelhybriden (*Populus trichocarpa* × *deltoides* 'Beaupré').

## 1.5 Pflanzliche Mechanismen der Abwehr von Pathogenen

Basierend auf den Wirkmechanismen der Pflanzen gegenüber Pathogenen wird zwischen qualitativer und quantitativer Resistenz unterschieden. Die qualitative Resistenz (vollständig) wird rassenspezifisch aktiviert. Als Mechanismus der qualitativen Resistenz fungiert die hypersensitive Reaktion (HR), die durch das Erkennen eines Organismus eingeleitet wird und in einem schnellen Zelltod an der Infektionsstelle resultiert (Durrant & Dong 2004). Eine HR bei Rostpilzinfektion konnte z. B. von Laurans & Pilate (1999) in einem Experiment mit *Populus deltoides* × *P. nigra* cv. Ogy und zwei physiologisch unterschiedlichen Rostpilzisolaten (*M. larici-populina* E1, E2) beobachtet werden; die Interaktion mit dem Isolat E1 war inkompatibel und mit E2 kompatibel. Bei einer kompatiblen Interaktion kann das virulente<sup>9</sup> Pathogen bei einer anfälligen Wirtspflanze zu einer Infektion führen, während das avirulente Pathogen bei einer resistenten Wirtspflanze keine Krankheit auslösen kann (inkompatible Interaktion). Die kompatible Interaktion zwischen Pappelklon und Rostpilz Isolat E2, die von Laurans & Pilate (1999) untersucht wurde, zeigte eine schnelle Blattbesiedlung des Rostpilzes ohne sichtbare Reaktion der Wirtspflanze. Symptome erschienen erst einige Tage nach der Inokulation kurz vor dem Durchbruch der Sporen auf der Blattoberfläche. Die inkompatible Interaktion mit dem Rostpilz Isolat E1 war 17 h nach Inokulation und 2 h nach Ausbildung des ersten Haustoriums durch den frühen

<sup>9</sup> Virulenz: bezeichnet das Ausmaß der Pathogenität; Pathogenität wiederum ist die Fähigkeit eines Organismus Krankheiten auszulösen.

Zusammenbruch und die Zerstörung des Zytoplasmas infizierter Zellen gekennzeichnet. Die Resistenz der Wirtspflanze wurde bei der inkompatiblen Interaktion durch eine HR vermittelt, da die Reaktion der Pflanze lokal erfolgte und nur benachbarte Zellen um die Infektionsstelle involviert waren (Laurans & Pilate 1999).

Bei der quantitativen Resistenz (partiell) wird eine Vielzahl polygen gesteuerter Resistenzmechanismen unabhängig von der Pathogenrasse ausgelöst. Rönnerberg-Wästljung et al. (2008) haben in Untersuchungen über die quantitative Resistenz gegenüber *Melampsora* spp. bei *Salix* Klonen spezifische *quantitative trait loci*<sup>10</sup> (QTL) für Rostpilzisolat und einige Resistenzkomponenten gefunden, die einen Rückschluss auf eine kombinierte Anwendung allgemeiner und spezifischer Abwehrmechanismen zulassen. Die QTLs spiegeln sich auch als bestimmtes Muster bei Vererbung wieder wie Samils et al. (2011) durch Rückkreuzung in der nachfolgenden Generation (F1: *S. viminalis* × *S. viminalis* × *S. schwerinii*) feststellen konnten. Bei Artverwandten F1 Generationen (*S. viminalis* × *S. viminalis*) zeigte sich, dass einige QTLs an der gleichen Genomregion lokalisiert sind, wie sie bei der Rückkreuzung gefunden wurden (Samils et al. 2011).

Die aktivierten Abwehrmechanismen der qualitativen und quantitativen Resistenz als Reaktion auf Pathogenbefall, die die Pflanze durch lokale oder systemische Ausbreitung präventiv gegen spätere Infektionen schützen, werden als induzierte Resistenz (IR) bezeichnet (Hammerschmidt 1999). Im direkten Zusammenhang mit IR werden bei vielen Holzgewächsen – einschließlich Angiospermen (z. B. *Populus* spp., Tsai et al. 2006) - phenolische Verbindungen wie Stilbene, Flavonoide, Lignane und Tannine erwähnt (Witzell & Martin 2008). Diese strukturell diverse Gruppe pflanzlicher Sekundärmetabolite können konstitutiv vorhanden sein oder werden bei Pathogenangriff synthetisiert, wodurch die konstitutive Konzentration an phenolischen Verbindungen erhöht wird (Wong 1973 zitiert in Bennett & Wallsgrove 1994). Die IR wird in zwei Kategorien unterteilt (Hammerschmidt 1999; Pieterse & van Loon 1999):

- 1) Die systemisch erworbene Resistenz (systemic acquired resistance, SAR) wird durch Nekrosen verursachende Pathogene ausgelöst und beinhaltet einen dauerhaften Schutz gegen ein breites Spektrum an Pathogenen (Durrant & Dong 2004). Die Signaltransduktion der SAR wird durch das Signalmolekül Salizylsäure (SA) vermittelt und ist weiterhin durch die Akkumulation sog. PR Proteine (pathogenesis-related proteins) und weiterer Enzyme wie der Phenylalanin-Ammonium-Lyase (PAL) charakterisiert (Stadnik & Buchenauer 2000; Durrant & Dong 2004).

---

<sup>10</sup> *Quantitative trait locus*: Genomabschnitt, der an der Ausprägung eines quantitativen Merkmals beteiligt ist

Über die systemische Induktion von Salizylaten bei Herbivorenangriff berichteten z. B. Ruuhola et al. (2001). Hierbei wurde die Konzentration an Salizylaten in Folge von Blattfraß durch *Phratora vitellinae* auf *Salix myrsinifolia* erhöht. Im Allgemeinen hängt die Höhe der Induktion von Salizylaten von drei Faktoren ab: den pflanzeigenen Substanzen, dem Entwicklungsstadium des pflanzlichen Organs und dem Genotyp der Pflanze (Ruuhola et al. 2001). Die SAR geht meistens mit einer lokalen Verstärkung der Zellwände sowie einer HR einher (Kogel et al. 1994). Die daraufhin folgende Ausbildung einer Resistenz im entfernten Gewebe wird als SAR bezeichnet (Durrant & Dong 2004).

- 2) Die induzierte systemische Resistenz (induced systemic resistance, ISR) wird durch die Besiedlung mit pflanzenwachstumsfördernden Rhizobakterien oder VA-Mykorrhizapilze aktiviert. Für ISR in Reaktion auf Besiedlung mit EM-Pilzen liegen bisher keine Studien vor. Nach Conrath et al. (2002) sind an der Signaltransduktion bei ISR die Phytohormone Jasmonsäure und/oder Ethylen beteiligt.

## 1.6 Problemstellung, Arbeitshypothese und Zielsetzung

Schnellwachsende Baumarten wie Pappeln und Weiden sind in der Kurzumtriebswirtschaft leistungsstarke Biomasseproduzenten für die Nutzung als Energiepflanzen. Eine Beeinträchtigung durch wirtschaftlich bedeutsame Krankheiten wie dem Rostpilzbefall, der durch *Melampsora* spp. verursacht wird, kann zu einem Ertragsverlust von bis zu 40% führen. Da bekannt ist, dass die Resistenz gegenüber Rostpilzen durch den Standort beeinflusst wird und nach ca. 10 Jahren von Pathogenen mit veränderten Virulenzen überwunden werden kann, ist der Anbau resistenter Klone eine wirkungsvolle aber zeitlich befristete Lösung.

Da Pappeln und Weiden physiologisch durch assoziierte Mykorrhizapilze beeinflusst werden und dieser Einfluss zu blattchemischen Veränderungen führen kann, stellt die Mykorrhizierung eine mögliche Einflussgröße auf die Anfälligkeit der Bäume gegenüber Rostpilzen dar. Die Auswirkung von Mykorrhizierung auf den Rostpilzbefall von Pappeln und Weiden ist noch nicht bekannt.

Bisherige Untersuchungen beschränkten sich auf die Prüfung bilateraler Effekte zwischen Ektomykorrhizierung und Weiden/Pappeln oder Rostpilzinfektion an Weiden/Pappeln. Daher sollten innerhalb dieses Projekts erstmals Grundlagen der multitrophen Interaktion zwischen Mykorrhizierung – Wirtspflanze (Pappeln und Weiden) – Rostpilzinfektion untersucht

werden. Basis dieser Untersuchungen bildeten: 1) ein Modellversuch unter kontrollierten Umweltbedingungen, bei dem ein Pappelklon kombiniert mit einem Ektomykorrhizapilzstamm und einem Rostpilzisolat zum Einsatz kamen und 2) zwei Feldversuche mit Pappel- und/oder Weidenklonen in Deutschland (Gülzow) und Schweden (Uppsala), die eine standortspezifische Mykorrhizierungs- und Rostpilzexposition beinhalteten. Folgende Hypothesen lagen den Untersuchungen zu Grunde:

Modellversuch zur Klärung der funktionell-mechanistischen Grundlagen der Interaktion von Mykorrhiza- und Rostpilzen an gemeinsamen Wirtspflanzen:

- 1) Rostpilzbefall führt zu einer zunehmenden Synthese von Sekundärmetaboliten bei Pappeln. Mykorrhizierung verringert diese Synthese der Wirtspflanze durch ihren zusätzlichen Assimilatentzug.
- 2) Alternative: Mykorrhizierung führt zu einer verbesserten Nährstoffversorgung der Wirtspflanze. Hierdurch kann die in Reaktion auf die Rostpilzinfektion hervorgerufene Produktion von Sekundärmetaboliten zur Pflanzenabwehr gefördert werden.

Feldversuch Gülzow (Deutschland) zur Untersuchung von Interaktionen von Mykorrhizierung und Rostpilzinfektion an gemeinsamen Wirtspflanzen:

- 1) Die Mykorrhizierungsrate an Pappel- und Weidenklonen beeinflusst ihre Anfälligkeit für Rostpilzinfektionen über ihre Auswirkungen auf die blattchemische Zusammensetzung.
- 2) Hohe Rostpilzanfälligkeit von Klonen führt zu geringer Mykorrhizierungsneigung, da der Assimilattransport zu den Wurzeln verringert wird.

Feldversuch Uppsala (Schweden) zur Untersuchung der Bedeutung von blattchemischen Effekten der Mykorrhizierung auf die Rostpilzanfälligkeit:

- 3) Neben ihrer Abundanz entscheidet die Diversität der Mykorrhizierung über das Ausmaß und die Qualität ihrer blattchemischen Wirkung auf die Rostpilzanfälligkeit von Weidenklonen.
- 4) Rostpilzresistenz und Mykorrhizierungsneigung von Weidenklonen sind aufgrund der gemeinsamen blattchemischen Effekte miteinander verbunden.

Zur Prüfung der Hypothesen dienten folgende Aufgabenstellungen:

- a) Analyse der blattchemischen Zusammensetzung mit und ohne Mykorrhizierung und Rostpilzinfektion (einfach und in Kombination) mit definierter Kombination von Wirtspflanze und Pilzstamm unter kontrollierten Umweltbedingungen
- b) Untersuchung der standort- und klonspezifischen Mykorrhizierung an Weiden- und Pappelklonen mit unterschiedlicher Rostpilzanfälligkeit im Feldversuch
- c) Prüfung auf Korrelation zwischen Mykorrhizierung und Rostpilzanfälligkeit im Feldversuch

## 2. Material und Methoden

Diese Arbeit gliedert sich in zwei Teilbereiche:

- 1) die Untersuchung der chemischen Blatt-Zusammensetzung von Pappeln in Interaktion mit und ohne Mykorrhizierung bzw. Rostpilzinfektion unter kontrollierten Umweltbedingungen im Gefäßversuch (spezifische Angaben dazu in Kap. 2.1)
- 2) die Untersuchung des Zusammenhangs von Mykorrhizierungsneigung und Rostpilzanfälligkeit bei Weiden- und Pappelklonen in Feldversuchen (spezifische Angaben dazu in Kap. 2.3)

Die Analysen von Wurzeln, Blättern und Boden der Gefäß- und Feldversuche wurden – soweit nicht anders angegeben – mit einheitlichen Methoden durchgeführt und daher im Kapitel 2.4 einmalig beschrieben.

Chemikalien und Feinchemikalien wurden - soweit nicht anders angegeben - von den Firmen Roth (Karlsruhe), Merck (Darmstadt) und Sigma-Aldrich (Seelze) bezogen. Die Bezugsquellen für Agar, Kits oder spezielle Reagenzien sind an den entsprechenden Stellen im Text aufgeführt.

### 2.1 Versuchsdesign des Gefäßversuchs

In einem Gefäßversuch sollte der Einfluss einer singulären bzw. dualen Pilzbesiedlung bei Pappeln auf die chemische Zusammensetzung ihrer Blätter – speziell der Abwehrstoffe – untersucht werden. Hierfür wurden Pappelstecklinge (*P. trichocarpa* Torr. and Gray × *P. deltoides* Bartr. ex Marsh. cv. Beaupré) mit und ohne EM-Pilz (*Hebeloma mesophaeum* (Pers.) Quélet Stamm MÜN) für vier Monate unter kontrollierten Bedingungen in Gefäßen (4 kg Boden pro Gefäß, 23 cm hoch, ø 19 cm) kultiviert. Es wurde ein nährstoffarmer Boden verwendet, um die Mykorrhizierungswirkung auf die Nährstoffversorgung der Wirtspflanze zu steigern. Die genauen Eigenschaften sowie elementaren Konzentrationen sind im Kapitel 2.4.1 zu finden. Zwei der insgesamt vier Varianten (Kontrolle, mit und ohne EM-Pilz, mit und ohne Rostpilz mit jeweils vier Wiederholungen) wurden 10 Tage vor Probenahme mit dem Rostpilz *Melampsora larici-populina* (*Mlp*, Isolat 98AG31 Moÿ-de-l'Aisne, Frankreich) inokuliert.

Die verwendeten Organismen stellen ein kompatibles System (Modellsystem) dar, da *H. mesophaeum* unter natürlichen Bedingungen Pappeln besiedelt und Beaupré gegenüber *Mlp* Rostpilz-anfällig ist. Die vier-monatige Dauer des Gefäßversuchs begründet sich zum einen darin, dass die Wirkung der Inokulation mit Ektomykorrhiza-Pilzen erst nach ca. drei

Monaten chemisch in den Blättern nachweisbar wird. Zum anderen sind nach dieser Zeit bereits bei Pappeln voll entwickelte Blätter ausgebildet, die für eine erfolgreiche Rostpilzinfektion benötigt werden. Auf Düngung wurde bei diesem Versuch verzichtet, da Düngung die Ausbildung von Mykorrhizierung sowie ihre Wirkung auf die Wirtspflanze beeinflussen kann (vgl. Baum & Makeschin 2000).

Die Untersuchungen der chemischen Zusammensetzung der Pappelblätter wurden mittels photometrischer Analysen (Kap. 2.4.2) sowie Flüssig-Chromatographie-Tandem-Massenspektrometrie (LC-MS/MS) an Extrakten (Kap. 2.4.3) und Pyrolyse-Feldionisation Massenspektrometrie (Py-FIMS) an Feststoffproben (Kap. 2.4.6) durchgeführt.

## **2.2 Biologisches Material für den Gefäßversuch**

### **2.2.1 *In-vivo* Kulturen der Wirtspflanze `Beaupré`**

Die im Gefäßversuch und zur Rostpilzvermehrung verwendeten Beaupré Stecklinge (5 cm lang) wurden unter kontrollierten Bedingungen (16h Tag bei 21°C, 8h Nacht bei 17°C) im Gewächshaus in Gefäßen mit jeweils 4 kg Boden (Textur: 71% Sand, 24% Schluff, 5% Ton; Elementgehalt:  $C_{org}$  7,1 g kg<sup>-1</sup>,  $N_t$  0,8 g kg<sup>-1</sup>,  $P_t$  0,5 g kg<sup>-1</sup>,  $K_t$  0,9 g kg<sup>-1</sup>,  $Mg_t$  1,0 g kg<sup>-1</sup>) kultiviert.

### **2.2.2 Isolierung und Vermehrung von Ektomykorrhiza (EM)-Pilzstämmen**

In der Kurzumtriebsplantage (KUP) Gülzow wurden unbeschädigte Fruchtkörper potenziell EM-bildender Pilzarten zur Gewinnung von Isolaten gesammelt und nach Phillips (1998) determiniert (Tab. 2.1, Anhang A3).

**Tabelle 2.1:** Fundorte der Fruchtkörper von Ektomykorrhiza (EM)-Pilzen unter Pappeln (*Populus* spp.) in der KUP Gülzow.

Fruchtkörper der EM-Pilze	Fundort (Pappelklon)
<i>Paxillus involutus</i>	Beaupré ( <i>P. trichocarpa</i> × <i>deltoides</i> )
<i>P. involutus</i>	Max 4 ( <i>P. nigra</i> × <i>maximoviczii</i> )
<i>Inocybe</i> sp.	Max 4 ( <i>P. nigra</i> × <i>maximoviczii</i> )
<i>Tricholoma argyraceum</i>	Beaupré ( <i>P. trichocarpa</i> × <i>deltoides</i> )
<i>Cortinarius</i> sp.	Muhle Larsen ( <i>P. trichocarpa</i> )
<i>Inocybe geophylla</i> var. <i>Lilacina</i>	Max 4 ( <i>P. nigra</i> × <i>maximoviczii</i> )
<i>Laccaria laccata</i>	Beaupré ( <i>P. trichocarpa</i> × <i>deltoides</i> )
<i>L. laccata</i>	Raspalje ( <i>P. trichocarpa</i> × <i>deltoides</i> )
<i>L. laccata</i>	Muhle Larsen ( <i>P. trichocarpa</i> )
<i>Inocybe geophylla</i>	Muhle Larsen ( <i>P. trichocarpa</i> )
<i>I. geophylla</i>	NE 42 ( <i>P. maxiimoviczii</i> × <i>trichocarpa</i> )
<i>I. geophylla</i>	Beaupré ( <i>P. trichocarpa</i> × <i>deltoides</i> )
<i>Scleroderma bovista</i>	NE 42 ( <i>P. maxiimoviczii</i> × <i>trichocarpa</i> )
<i>Hebeloma mesophaeum</i>	<i>P. tremula</i>
<i>H. leucosarx</i>	<i>P. tremula</i>

Aus den Hüten der Fruchtkörper wurde Trama entnommen und auf autoklaviertes (20 min, 121°C, 1 bar) Difco™ potato dextrose agar- (BD, Heidelberg) Medium (PDA-Medium) (39 g l<sup>-1</sup> PDA) mit Chlortetracyclin (50 ppm, Sigma-Aldrich, Seelze) in Petrischalen (Greiner Bio-One, Solingen) überführt. Diese Stammkulturen wurden bei 24°C im Dunkeln inkubiert. Bei Myzelwachstum auf dem Medium wurden Agarblöcke (1 cm<sup>2</sup>) mit jungem Myzel vom Rand der Kultur unter sterilen Bedingungen ausgestochen und zum weiteren Wachstum auf PDA-Medium ohne Antibiotikum in Petrischalen gesetzt. Zur Vermehrung und Erhaltung der EM-Pilzstämme wurden von jeder Petrischale jeweils drei Agarblöcke im Abstand von drei Monaten auf frische Platten mit PDA-Medium überführt. Die Mehrheit der EM-Pilze wachsen unter *in vitro* Bedingungen nicht oder nur sehr langsam. Daher ist die Kultivierbarkeit und ein verhältnismäßig schnelles Wachstum ein entscheidendes Selektionskriterium für die Wahl von Pilzstämmen zur Inokulumproduktion. Da der isolierte Stamm von *Hebeloma mesophaeum* ein schnelles *in vitro* Wachstum und damit eine gute Vermehrbarkeit aufwies und diese Pilzart zu den häufigen Mykorrhizierungspartnern von Pappelklonen zählt, wurde dieser Stamm zur Inokulumproduktion ausgewählt.



### 2.2.3 Produktion des EM-Inokulums

Die Produktion des EM-Inokulums (*Hebeloma mesophaeum*) erfolgte in zwei Schritten. Der erste Schritt stellte die Vermehrung des Myzels für die initiale Beimpfung des Inokulationssubstrats dar. Hierfür wurde *H. mesophaeum* für einen Monat auf PDA-Medium in Petrischalen kultiviert. Im zweiten Schritt wurden die myzelbewachsenen Agarblöcke unter sterilen Bedingungen in ein autoklaviertes Torf-Seramis® Substrat (Pilzinokulum) (9:1 vol/vol) in Twist-Off Gläsern überführt. Als Nährlösung wurde sterile (autoklaviert), modifizierte Melin Norkrans-(MMN-) Lösung nach Kottke et al. (1987) (Tab. 2.2) hinzugegeben (200 ml MMN pro 1 l Pilzinokulum). Thiamin wurde erst bei RT des autoklavierten Mediums steril filtriert hinzugefügt. Das Pilzinokulum wurde bei 24°C im Dunkeln für einen Monat inkubiert, bevor es zur Inokulation des Bodens im Gefäßversuch verwendet werden konnte.

Je 200 ml des myzeldurchwachsenen Pilzinokulums wurden pro Pappelsteckling in die entsprechenden Pflanzgefäße zusammen mit dem Boden gefüllt. Die Varianten Kontrolle und Rostpilz erhielten autoklaviertes Pilzinokulum um mögliche direkte chemische bzw. physikalische Einflüsse des Inokulums auf das Pflanzenwachstum auszugleichen.

**Tabelle 2.2:** Zusammensetzung der modifizierten Melin Norkrans-Nährlösung nach Kottke et al. (1987).

Stammlösung	Konzentration [g l <sup>-1</sup> H <sub>2</sub> O]	Volumen [ml]
CaCl <sub>2</sub>	0,05	-
NaCl	0,025	-
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	0,5	-
(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	0,25	-
MgSO <sub>4</sub> x 7H <sub>2</sub> O	0,15	-
FeCl <sub>3</sub> x 6H <sub>2</sub> O	0,001	-
Glucose	10	-
Kaseinhydrolysat	1	-
Malzextrakt	5	-
Thiamin (10 mg/100 ml)	-	1
H <sub>2</sub> O	-	ad 1000
<b>Spurenelementlösung</b>	siehe <b>Tab. 2.3</b>	10

**Tabelle 2.3:** Komponenten der Spurenelementlösung des Melin Norkrans-Mediums.

Stammlösung	Konzentration [g l <sup>-1</sup> H <sub>2</sub> O]
KCl	3,728
H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub>	1,546
MnSO <sub>4</sub> x H <sub>2</sub> O	0,845
ZnSO <sub>4</sub> x 7H <sub>2</sub> O	0,575
CuSO <sub>4</sub> x 5H <sub>2</sub> O	0,125
(NH <sub>4</sub> ) <sub>6</sub> MO <sub>7</sub> O <sub>24</sub> x 4H <sub>2</sub> O	0,018

#### 2.2.4 *In-vivo* und *in-situ* Vermehrung des Rostpilzes *Melampsora larici-populina* (Mlp)

Die Vermehrung des Rostpilzstamms *Melampsora larici-populina* (Mlp, Isolat 98AG31) Moÿ-de-l'Aisne, Frankreich fand auf mindestens drei Monate alten Pappeln (cv. 'Beaupré') mit voll entwickelten Blättern statt. Die nachfolgend beschriebene Methode wurde auch beim Gefäßversuch angewendet. Die abaxiale Seite der Blätter wurde mit Aqua<sub>dest</sub> angefeuchtet, um die Öffnung der Stomata zu fördern. Nach dem Auftragen der Uredosporen (1 mg) mit einem Pinsel wurden die Pflanzen für 12 h mit dunkler Plane abgedeckt, um die Keimung der Rostpilzsporen zu fördern. Um den Luftaustausch zu gewährleisten und Kreuzkontaminationen zu verhindern, wurde nach dieser Zeit die Plane oben geöffnet und nach weiteren 12 h vollkommen entfernt. Die Sporen wurden nach 10 Tagen von den Blättern geerntet, um sie anschließend wieder zu inokulieren. Diese Methode brachte eine sehr mäßige Ausbeute. Ein weiteres Problem war die starke Akkumulation der Uredosporenlager auf der Blattoberfläche, so dass eine quantitative Bestimmung beim Gefäßversuch nicht möglich war.

Daher wurde im Rahmen der vorliegenden Arbeit zur Rostpilzvermehrung eine neue *in vivo* und *in situ* Methode eingesetzt. Hierfür wurden die voll entwickelten Blätter zur Inokulation mit der abaxialen Seite nach oben in Petrischalen mit Wasserfilm gelegt. Sie wurden mittels einer Airbrush Pistole (Conrad, HP 320, Hirschau, Germany) mit Uredosporen (1 mg ~ 8×10<sup>5</sup> Uredosporen/ml) in Wasser-Agar Lösung (0,1 g l<sup>-1</sup>) besprüht. Die Inkubation der abgedeckten Blätter erfolgte in einem Klimaschrank (kontinuierliche Beleuchtung, Luftfeuchtigkeit 80%, 19°C) für 10 Tage.

## 2.3 Feldversuche an den Standorten Gülzow (Deutschland) und Uppsala (Schweden)

### 2.3.1 Untersuchungsstandorte und Versuchsdesign

Um die Rate und Diversität der Ektomykorrhizapilze in Abhängigkeit von der Rostpilzanfälligkeit an Weiden- und Pappelklonen zu erfassen, wurden Blatt- und Wurzelproben im Herbst 2011 in zwei KUPs in Gülzow, Deutschland (53,82°N, 12,05°O) und Uppsala, Schweden (59,82°N, 17,64°W) genommen. Die Untersuchungen erfolgten mittels blatt- und bodenchemischen Analysen sowie morphologisch-anatomischer Charakterisierung der EM-Pilze, die mit molekularbiologischer Identifikation der Pilzpartner kombiniert wurde.

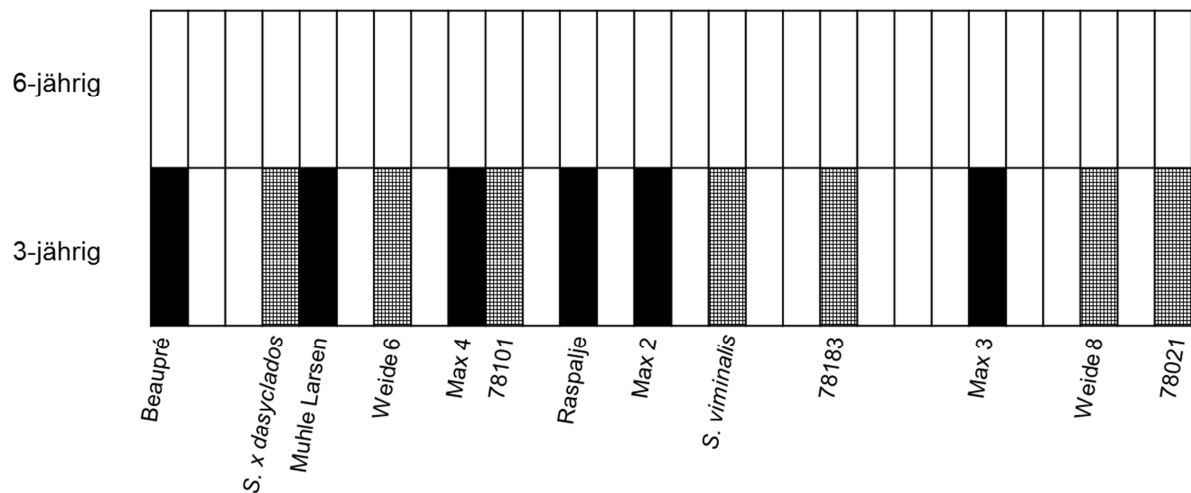
Die Rostpilzinfektion ist witterungsabhängig und unterliegt einem saisonalen Unterschied im Infektionsdruck. Daher ist eine Bonitur des Rostpilzbefalls nicht in jedem Jahr möglich. In der KUP Uppsala war dies im Versuchsjahr 2011 der Fall, so dass eine Bonitur nicht durchgeführt werden konnte. Die Einordnung der *S. viminalis* Klone (Uppsala) in resistente bzw. anfällige Klone erfolgte daher auf der Basis von Literaturangaben (Tab. 2.5); bei der Auswahl und Einordnung der Pappel- und Weidenklone (Gülzow) wurden die Boniturdaten der LFA Gülzow (siehe Anhang A2) sowie entsprechende Literatur herangezogen (Tab. 2.4). Die physiologische Reaktion von Pappel- und Weidenklonen auf die Infektion mit Rostpilzen – insb. mit *Mlp* – verläuft unterschiedlich. Resistenz bei Weidenklonen meint im Allgemeinen eine quantitative (d. h. partielle) Resistenz, während bei Pappelklonen von einer qualitativen (d. h. vollständigen) Resistenz gesprochen wird. Eine qualitative Resistenz ist bei Weidenklonen möglich, kommt jedoch seltener vor als die quantitative Resistenz (Lascoux et al. 1996). Zur Vereinfachung werden in dieser Arbeit bzgl. der Anfälligkeit gegenüber Rostpilzen bei beiden Baumarten resistente und anfällige Klone unterschieden.

Die KUP Gülzow wurde 1993 etabliert und setzte sich zum Probenahmezeitpunkt aus 3- und 6-jährigen Rotationsblöcken mit je drei randomisierten Wiederholungen (Pflanzverband: 1,50 m x 0,50 m; 13333 Bäume/ha; Parzellengröße: 135 m<sup>2</sup>; Gurgel 2013) bestehend aus Weiden- und Pappelklonen (interspezifisch) zusammen. Bei Hryniewicz et al. (2010) wurde bei Untersuchungen in dieser KUP festgestellt, dass mit zunehmender Rotationslänge wie z. B. bei 6-jähriger Rotation die Mykorrhizierungsrate abnimmt. Die Boniturdaten der LFA belegen den gleichen Zusammenhang von Rotationslänge und Rostpilzanfälligkeit. Daher wurden in dieser Arbeit Weiden- und Pappelklone in 3-jähriger Rotation (1-jähriger Aufwuchs auf 18-jährigem Wurzelstock) untersucht um eine starke Ausprägung möglicher Interaktionen von Mykorrhizierung und Rostpilzinfektion zu erreichen.

Es wurden insgesamt 13 Pappel- und Weidenklone mit unterschiedlicher Rostpilzanfälligkeit (mit vier Wiederholungen) ausgewählt (siehe Abb. 2.1, Tab. 2.4):

- 1) sechs Pappelklone (*Populus* spp.)  
 Rostpilz-anfällig: Beaupré, Muhle Larsen, Raspalje  
 Rostpilz-resistent: Max 2, Max 3, Max 4
- 2) sieben Weidenklone (*Salix* spp.)  
 Rostpilz-anfällig: Klon 78183, Weide 8, *Salix* × *dasyclados*  
 Rostpilz-resistent: Klon 78021, Klon 78101, *Salix viminalis*, Weide 6

Rotation



**Abbildung 2.1:** Anordnung der untersuchten Klone in der KUP Gülzow am Beispiel des Blocks A; Pappelklone: schwarz, Weidenklone: kariert.

**Tabelle 2.4:** Klassifizierung der Pappel- (*Populus* spp.) und Weidenklone (*Salix* spp.) der LFA-Gülzow in Rostpilz-anfällige und Rostpilz-resistente Klone.

Gattung	Klon	Klassifizierung	Referenz
<i>Populus</i> spp.	Muhle Larsen ( <i>P. trichocarpa</i> × <i>trichocarpa</i> )	anfällig	Pinon & Frey 2005
	Raspalje ( <i>P. trichocarpa</i> × <i>deltoides</i> )	anfällig	Tabbush & Beaton 1998
	Beaupré ( <i>P. trichocarpa</i> × <i>deltoides</i> )	anfällig	Frey et al. 2005
	Max 2 ( <i>P. nigra</i> × <i>maximoviczii</i> )	resistent	Röhricht et al. 2011
	Max 3 ( <i>P. nigra</i> × <i>maximoviczii</i> )	resistent	Röhricht et al. 2011
	Max 4 ( <i>P. nigra</i> × <i>maximoviczii</i> )	resistent	Röhricht et al. 2011
<i>Salix</i> spp.	78183 ( <i>S. viminalis</i> )	anfällig	Rönnberg-Wästljung et al. 2008
	<i>Salix</i> × <i>dasyclados</i>	anfällig	Ramstedt 1999
	Weide 8 ( <i>S. viminalis</i> × <i>purpurea</i> )	anfällig	Nach Bonitur der LFA Gülzow eingeordnet
	78021 ( <i>S. viminalis</i> )	resistent	Toome et al. 2006
	78101 ( <i>S. viminalis</i> )	resistent	McCracken & Dawson 2003
	<i>Salix viminalis</i>	resistent	Gullberg & Rytman 1993
	Weide 6 ( <i>S. caprea</i> × <i>viminalis</i> )	resistent	Nach Bonitur der LFA Gülzow eingeordnet

Die randomisierte Versuchsanlage (Pflanzverband: 0,70 m x 0,70 m; 20000 Bäume/ha; Parzellengröße: 150 m<sup>2</sup>; Baum et al. 2002) in Uppsala, Schweden wurde im Jahr 1994 mit insg. 16 Weidenklonen (*Salix viminalis*, je vier Wiederholungen) bei 3-jähriger Rotationsdauer angelegt. Zum Zeitpunkt der Probenahme wiesen die Weidenklone einen 1-jährigen Aufwuchs auf 17-jährigen Wurzelstöcken auf.

Von sechs Weidenklonen der Art *Salix viminalis* wurden Proben (intraspezifisch, vier Wiederholungen je Klon) genommen, die auf Grund von Literaturangaben in Rostpilz-anfällige und -resistente Klone (Tab. 2.5, Abb. 2.2) eingeteilt wurden:

- 1) Rostpilz-anfällig: Gustav, Jorr, Klon 78183
- 2) Rostpilz-resistent: Rapp, Orm, Ulv

	<b>Rapp</b>		<b>Ulv</b>				<b>Gustaf</b>
		<b>Gustaf</b>		<b>78183</b>		<b>Jorr</b>	
<b>78183</b>	<b>Jorr</b>			<b>Orm</b>			
	<b>Orm</b>					<b>Rapp</b>	<b>Ulv</b>
<b>Ulv</b>	<b>Gustaf</b>	<b>78183</b>				<b>Ulv</b>	<b>Orm</b>
	<b>Orm</b>				<b>Rapp</b>		
	<b>Jorr</b>		<b>Rapp</b>	<b>78183</b>			<b>Jorr</b>
				<b>Gustaf</b>			

**Abbildung 2.2:** Anordnung der Rostpilz-anfälligen und -resistenten *Salix viminalis* Klone in der KUP Uppsala, Schweden. 3-jährige Rotationsdauer und jeweils vier Wiederholungen; Rostpilz-anfällige Klone: Gustav, Jorr, Klon 78183 und Rostpilz-resistente Klone: Rapp, Orm, Ulv.

**Tabelle 2.5:** Klassifizierung der *S. viminalis* Klone der KUP Uppsala, Schweden in Rostpilz-anfällige und -resistente Klone.

Klon	Klassifikation	Referenz
Gustav	anfällig	Mc Cracken & Dawson 2003
Jorr	anfällig	Hanley et al. 2011
78183	anfällig	Rönnberg-Wästljung et al. 2008
Rapp	resistent	Pei et al. 2004
Orm	resistent	Mc Cracken & Dawson 2003
Ulv	resistent	Mc Cracken & Dawson 2003

## 2.4 Chemische Analysen von Blatt- und Bodenproben

Zur Untersuchung der Blätter des Gefäßversuchs und der Freilandversuche auf die Konzentrationen des Gesamtphenolgehalts, der kondensierten Tannine (CT), der Salizylsäure (SA), die molekular-chemische Zusammensetzung mittels Py-FIMS und die C/N-Konzentration wurden die Proben bei 45°C und die Stängel bei 60°C bis zur Gewichtskonstanz getrocknet. Die Bodenproben wurden für die chemische Untersuchung bei Raumtemperatur getrocknet und gesiebt (<2 mm). Pflanzen- und Bodenproben wurden nach der Trocknung gemahlen (ø 0,5 mm, Mühle: Retsch, Haan, Germany).

### 2.4.1 pH-Wert Bestimmung des Bodens

Der Boden pH-Wert wurde elektrometrisch (HI 110, MBH Engineering Systems, Lynnfield, USA) unter Verwendung von gesiebten Bodenproben (10 g) und Zugabe von 0,01 M CaCl<sub>2</sub>-Lösung bei einem Boden : Lösungsverhältnis von 1 : 2,5 nach einer Stunde gemessen (Scheffer & Schachtschabel 2010).

### 2.4.2 Bestimmung der Konzentration von Phenolen total und kondensierten Tanninen in Blättern

Da Phenole im Allgemeinen und kondensierte Tannine im Speziellen wesentlich zur Pflanzenabwehr gegen Blattpathogene beitragen können, wurden ihre Konzentrationen in den Blättern sowohl im Gefäßversuch als auch in den Feldversuchen untersucht. Zur Extraktion der Phenole (total) sowie der CT aus Blättern wurde die Methode nach Kraus et al. (2004) angewandt, bei der jeweils 50 mg gemahlenes Pflanzenmaterial mit 10 ml Aceton (50%) als Extraktionsmittel für 24 h geschüttelt wurde. Nach Zentrifugation der Extrakte wurde der Überstand dekantiert und die Probe zum zweiten Mal mit Aceton (50%, 10 ml) für

1 h extrahiert. Beide Extrakte wurden anschließend vereint. Die Messung der Phenolkonzentration im Extrakt erfolgte mit der Folin-Ciocalteu Analyse (Scalbert et al. 1989) mittels Photometer (Milton Roy Spectronic Genesys 5, Artisan™ Technology Group, Champaign, USA) ( $\lambda=760$  nm). Die Konzentration der CT im Extrakt wurde nach der Butanol-HCL Methode (Porter et al. 1986) bei  $\lambda=550$  nm ermittelt. Zur Erstellung der Kalibrierreihe wurde Gallsäure als Standard genutzt. Die Konzentrationen der Phenole (total) bzw. der kondensierten Tannine wurden auf Basis des Lambert Beer'schen Gesetzes berechnet:

$$1) \text{ Phenole (total) } = E_{760} * e * f$$

$$2) \text{ kondensierte Tannine } = E_{550} * e * f$$

Die Extinktion (E) wurde bei  $\lambda=760$  nm bzw.  $\lambda=550$  nm gemessen und mit dem Extinktionskoeffizienten e für Phenole bzw. CT und dem Verdünnungsfaktor f multipliziert. Die Konzentration der Phenole und CT wird in  $\text{mg g}^{-1}$  Trockengewicht angegeben.

Die Phenolkonzentration wurde lediglich in den Blättern des Gefäßversuchs bestimmt, wohingegen die Konzentration an CT sowohl in den Blättern des Gefäßversuches als auch in den Blättern der Feldversuche in Gülzow und Uppsala gemessen wurden. Da der Gefäßversuch vor den Feldversuchen stattfand, sollten zunächst die Gesamtheit der Phenole gemessen werden, um daraufhin den Anteil der CT bestimmen zu können. Hierbei konnte festgestellt werden, dass eine signifikante Änderung der CT Anteile an den Phenolen (total) in den pilzlichen Varianten verzeichnet werden konnte (vgl. Kap. 3.1.1). Die Konzentrationen der CT in den Blättern erwiesen sich im Gefäßversuch als geeignete Indikatoren der Interaktion von Pilzen mit der besiedelten Wirtspflanze, so dass sie auch in den Feldversuchen analysiert wurden.

### **2.4.3 Extraktion der Salizylsäure aus Blattproben**

SA stellt in der Pflanzenabwehr eine Schlüsselfunktion bei der Aktivierung bestimmter Antworten dar. Daher wurde Salizylsäure (SA) aus den Blattproben des Gefäßversuchs und der Feldversuche Gülzow und Uppsala wie in Baum et al. (2009) beschrieben extrahiert. 100 mg gemahlenes Pflanzenmaterial wurde mit 10 ml Methanol (50%) für 20 min geschüttelt und anschließend filtriert. Die Filter wurden mit 5 ml Methanol (50%) gewaschen. Die Analyse der Methanolextrakte (50%) zur Bestimmung der SA Konzentration erfolgte mittels LC-MS/MS (MAT TSQ 700, Finnigan Electron, Dreieich, Germany).



#### 2.4.4 Erfassung der Chlorophyllkonzentration in den Blattproben der Feldversuche

Um Informationen über das photosynthetische Potential der Pflanzen zu bekommen, wurde die Gesamtchlorophyllkonzentration ( $\text{Chl}_t$ ) nach einer modifizierten Methode von Hiscox & Israelstam (1979) nach Extraktion mit Dimethylsulfoxid (DMSO) photometrisch gemessen. DMSO bietet den Vorteil, dass Chlorophyll in diesem Lösungsmittel stabil bleibt, während es z. B. in Aceton schnell zerfällt (Richardson et al. 2002). Je Probe wurden 100 mg frisches Blattmaterial (ohne Hauptnervatur) in ein 2 ml Reaktionsgefäß gegeben und mit 2 ml DMSO verschlossen für 2 Stunden im Heizblock (HLC-Heap Labor Consult, Bovenden) bei 65°C inkubiert. Der Überstand wurde nach Zentrifugation (5 min bei 15000 x g) in Glasküvetten (Rotilabo®-Präzisions-Glasküvetten, Roth, Karlsruhe) pipettiert. Die Extinktion wurde innerhalb von 20 min bei 645 nm (Chl a) und 663 nm (Chl b) gemessen und gegen DMSO (reinst) als Referenz bestimmt. Zusätzlich erfolgte eine Messung bei 750 nm als Korrekturwert, der von den übrigen Messwerten subtrahiert wurde. Die Berechnung der Chlorophyllkonzentration (gesamt) erfolgte unter Berücksichtigung der Extinktionskoeffizienten von Chl a und Chl b nach den Gleichungen von Arnon (1949), die für DMSO als Extraktionsmittel anwendbar sind (Richardson et al. 2002). Die Chlorophyllkonzentrationen wurden als  $\text{mg l}^{-1}$  wiedergegeben und in  $\mu\text{g Chl mg}^{-1} \text{ FM}$  umgewandelt.

Gleichungen nach Arnon (1949):

$$\text{Chl a (mg l}^{-1}\text{)} = (12,7 * (A_{663} - A_{750})) - (2,69 * (A_{645} - A_{750}))$$

$$\text{Chl b (mg l}^{-1}\text{)} = (22,9 * (A_{645} - A_{750})) - (4,68 * (A_{663} - A_{750}))$$

$$\text{Chl}_t (\text{mg l}^{-1}) = (20,2 * (A_{645} - A_{750})) + (8,02 * (A_{663} - A_{750}))$$

#### 2.4.5 Analyse der C- und N-Konzentrationen der Blatt- und Bodenproben

Die Analyse der C und N Konzentrationen von Blatt- und Bodenproben erfolgte mittels Vario EL CNS-Analyser (Elementar Analysensysteme, Hanau, Germany) und wurde nach Angabe des Herstellers durchgeführt.

#### 2.4.6 Molekular-chemische Blattanalyse des Gefäßversuchs mittels Pyrolyse-Feldionisation Massenspektrometrie (Py-FIMS)

Die Analyse der molekular-chemischen Zusammensetzung der Blattproben erfolgte mittels Py-FIMS Analyse im MAT 95 Massenspektrometer (Finnigan, MAT, Bremen, Germany). Die Auswertung erfolgte 1) über die Zusammenfassung in Stoffklassen sowie 2) über die Auswertung einzelner Resistenz-relevanter Substanzen zwischen den unterschiedlichen Varianten des Gefäßversuchs. Die Analysen wurden mit einer Probenmenge von 0,4 mg und

drei wiederholten Messungen pro echter Wiederholung ( $n$  total pro Variante = 9) durchgeführt. Die Pyrolyse fand in einem Temperaturbereich von 50 - 700°C statt. Zusätzlich wurden die Proben per Hochauflösung ( $R = 5000$ , 10%-Tal) analysiert. Die Ausgabe der Gesamtionenintensitäten (TII) erfolgt in Spektren und Thermogrammen, die Ergebnisangabe in % TII (Schulten 1996; Schlichting & Leinweber 2009).

## **2.5 Charakterisierung der EM in Gefäß- und Feldversuchen**

### **2.5.1 Bestimmung der EM-Rate**

Zur Bestimmung der EM-Rate wurden Feinwurzeln zur Untersuchung herangezogen. Da keine Definition für Feinwurzeln existiert und die Klassifikationskriterien von Studie zu Studie variieren (Hendricks et al. 2000), werden Feinwurzeln im Allgemeinen auf Basis des Durchmessers definiert, d. h.  $<1$  mm und/oder  $<2$  mm.

Die Feinwurzeln ( $\varnothing <2$  mm) wurden vorsichtig durch Waschen mit Leitungswasser vom Boden befreit. Unter dem Binokular (GSZ 2T, Askania Mikroskop Technik, Rathenow) wurden vitale Feinwurzeln auf Grund des Turgordrucks identifiziert. Nekrotische Feinwurzeln (eingetrocknet, faltig) wurden nicht in die Bestimmung der EM-Rate einbezogen. Die weitere Klassifizierung der Proben erfolgte durch quantitative Aufteilung der vitalen Wurzelspitzen in nicht-ektomykorrhizierte (NM) und ektomykorrhizierte (EM) Wurzelspitzen. Die Häufigkeit der EM wird nach Agerer (1991) wie folgt berechnet:

$$\text{EM-Rate} = \left( \frac{\text{Anzahl der EM Wurzelspitzen}}{\text{Gesamtanzahl der Wurzelspitzen (NM+EM)}} \right) \times 100\%$$

Die EM-Rate wurde beim Gefäßversuch an mind. 500 Wurzelspitzen pro Probe bestimmt, so dass pro Variante insgesamt 2000 Feinwurzelspitzen ausgezählt wurden. Bei den Feldversuchen wurden zur Berechnung der EM-Häufigkeit 1000 Wurzelspitzen gezählt und die EM-Feinwurzeln in Morphotypen klassifiziert. Mindestens zwei EM-Wurzelspitzen pro Morphotyp wurden bis zur nachfolgenden morphologisch-anatomischen Charakterisierung sowie der molekularbiologischen Untersuchung in 1,5 ml Reaktionsgefäße überführt, mit Aqua<sub>dest</sub> bedeckt und bei -20°C gelagert.

### **2.5.2 Morphologisch-anatomische Charakterisierung der EM-Pilze**

Die morphologisch-anatomische Charakterisierung der EM-Pilze aus den Feldversuchen Gülzow und Uppsala diente zur Erfassung der EM-Diversität. Folgende makroskopische und mikroskopische Kriterien (vgl. Agerer 1987-1998; Haug 2002) wurden zur Bestimmung herangezogen.

#### makroskopisch:

- Verzweigungstyp der Ektomykorrhiza (siehe Abb. 2.3)
- Farbe des gesamten Habitus der Ektomykorrhiza
- Farbe der Ektomykorrhiza-Spitze
- Abziehende Hyphen:  
Oberflächenerscheinung (glatt, abziehende Hyphen)  
Vorhandensein von Rhizomorphen<sup>11</sup>  
Vorkommen von Zystiden<sup>12</sup> und Sklerotien<sup>13</sup>

#### mikroskopisch:

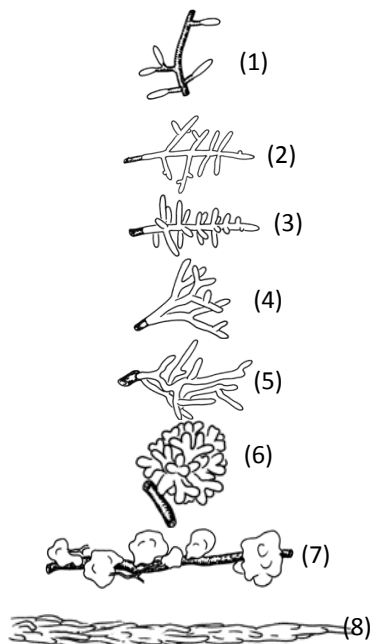
- Struktur des äußeren Mantels (pseudoparenchymatisch, plectenchymatisch)  
Zur Untersuchung des äußeren Mantels wurde ein Rechteck aus der obersten Mantelschicht - beginnend an der Feinwurzelspitze nach unten - mit einem Skalpell und einer Seziernadel unter dem Stereomikroskop (Wild M3Z, Leica, Wetzlar) präpariert.

---

<sup>11</sup> Rhizomorphe: deutlich sichtbarer, wurzelartiger Hyphenstrang (Phillips 1998)

<sup>12</sup> Zystide: sterile, meist vergrößerte Zellen im Hymenium, auf der Huthaut oder an der Stieloberfläche (Phillips 1998)

<sup>13</sup> Sklerotium: knolliges Gebilde aus fest verflochtenen Hyphen; Überdauerungsorgan (Phillips 1998)



**Abbildung. 2.3:** Morphologie der Verzweigungstypen von Ektomykorrhizen nach dem online Programm DEEMY (2004, Agerer & Rambold).

- (1) Abwesend
- (2) Monopodial-gefiedert
- (3) Monopodial-pyramidal
- (4) Dichotom
- (5) Unregelmäßig gefiedert, dichotomartig
- (6) Korallenförmig
- (7) Tuberkelartig
- (8) Zopfähnlich

Die erfassten Merkmale wurden mittels des online-Programms DEEMY (2004, Agerer & Rambold) zur Bestimmung der Gattung – und wenn möglich auch der Art – ausgewertet. Die Zuordnung zur Baumgattung wird bei DEEMY automatisch miteinbezogen.

Zur Prüfung der Identität des mykorrhizierenden Pilzpartners wurde ergänzend die DNA-Sequenzierung vorgenommen. Hierbei wurden die ITS- (internal transcribed spacer) und LSU- (large subunit) Regionen sequenziert. Die finale Einordnung der Mykorrhizierungstypen erfolgte unter Abstimmung von morphologisch-anatomischen und molekularbiologischen Ergebnissen.

## 2.6 Molekularbiologische Methoden

Um die ITS- und LSU-Regionen der EM-Pilze sequenzieren zu können, wurde zunächst die DNA aus den EM-Wurzelspitzen extrahiert, die ITS- und LSU-Regionen wurden durch Anwendung der PCR-Methode amplifiziert, die PCR-Produkte wurden gereinigt und mittels Gelelektrophorese überprüft, so dass die Proben nach Messung der DNA-Konzentration zur Sequenzierung verschickt werden konnten.

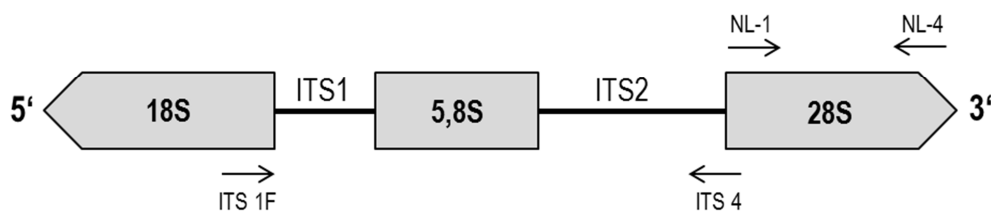
### 2.6.1 Extraktion pilzlicher DNA aus EM-Feinwurzeln

Die Referenzproben der morphologisch-anatomischen Charakterisierung wurden mit einem Pistill unter sterilen Bedingungen zerstoßen. Zur Extraktion der pilzlichen DNA wurde das

PeqGOLD Plant DNA Mini Kit (Peglab Biotechnologie, Erlangen) ohne Einsatz der RNase A verwendet.

### 2.6.2 Amplifizierung der ITS- und LSU-Regionen der rDNA

Die DNA-Proben wurden zur Amplifizierung von zwei DNA-Regionen weiter verwendet – die ITS und LSU. Eine schematische Darstellung dieser Regionen zeigt Abb. 2.4. Die PCR-Reaktionen wurden mit den Vorwärts- und Rückwärtsprimern ITS 1F – ITS 4 (Biomers, Ulm) und mit NL-1 – NL-4 (Biomers, Ulm) durchgeführt (Tab. 2.6 und 2.7).



**Abbildung 2.4:** Schematisch dargestellter Ausschnitt der ribosomalen DNA mit den ITS- und LSU-Regionen. Die S-Regionen (18S, 5,8S, 28S; S=Svedberg) geben die Größe der kodierenden, hoch konservierten Regionen wieder, wobei die 28S der LSU (large subunit) entspricht. Die ITS-Regionen 1+2 (Internal Transcribed Spacer) stellen nicht-codierende Regionen mit geringer Variabilität dar.

**Tabelle 2.6:** Sequenzen der verwendeten Primer bei den PCR-Reaktionen. ITS 1F und NL-1 wurden als Vorwärts- und ITS 4 sowie NL-4 als Rückwärtsprimer eingesetzt.

Primer	Sequenz in 5' - 3' -Richtung	Referenz
ITS 1F	CTT GGT CAT TTA GAG GAA GTA A	Gardes & Bruns 1993
ITS 4	TCC TCC GCT TAT TGA TAT GC	White et al. 1990
NL-1	GCA TAT CAA TAA GCG GAG GAA AAG	O'Donnell 1993
NL-4	GGT CCG TGT TTC AAG ACG G	

In dieser Arbeit wurden beide DNA-Regionen ITS und LSU sequenziert, um durch ihre Kombination mehr Informationen über die untersuchten EM-Pilze zu erhalten. Die Auswahl geeigneter Proben basierte auf den nachfolgenden Analyseergebnissen der PCR-Reaktionen sowie der DNA-Aufreinigung und -Konzentrationsmessung. Die Zusammensetzung des Reaktionsansatzes ist in Tabelle 2.7 wiedergegeben. Die PCR-Reaktionen zur Amplifikation der ITS bzw. LSU wurden mit dem Cyclor Cyclon 96 (Peglab Biotechnologie, Erlangen) nach Haug (2002) durchgeführt (Tab. 2.8, 2.9).

**Tabelle 2.7:** Spezifische Zusammensetzung der Reaktionskomponenten für die PCR der EM-Pilzproben aus Gülzow und Uppsala, Schweden. Als Vorwärtsprimer wurden ITS 1F bzw. NL-1 verwendet; die Rückwärtsprimer sind ITS 4 bzw. NL-4.

Komponenten	Volumen/Reaktion [μl]	Absolute Menge	Endkonzentration
Amplifikations- Puffer (10x ohne MgCl <sub>2</sub> )	5	---	1x
MgCl <sub>2</sub> (25 mM)	5	25 mM	2,5 mM
dNTP-Mix (je 2 mM)	5	2 nmol	200 μM
Vorwärtsprimer (10 pmol)	2,5	10 nmol	0,5 μM
Rückwärtsprimer (10 pmol)	2,5	10 nmol	0,5 μM
<i>Taq</i> -Polymerase (5U/μl)	0,5	5 U	0,05 U/μl
DNA-Matrix	2	---	---
H <sub>2</sub> O <sub>bidest</sub>	ad 50	---	---

**Tabelle 2.8:** PCR-Programm nach Haug (2002) zur Amplifizierung der ITS 1- und 2-Regionen (Primer: ITS 1F, ITS 4) von den EM-Pilzproben aus Gülzow und Uppsala, Schweden.

Reaktion	Temperatur [°C]	Zeit [min]	Anzahl der Zyklen
Initiale Denaturierung	94	03:00	1
<b>Loop 1</b>			10 (touch down)
Denaturierung	94	00:30	
Variables Annealing	55-46	00:45	
Elongation	72	01:00	
<b>Loop 2</b>			25
Denaturierung	94	00:30	
Annealing	45	00:45	
Elongation	72	01:00	
Finale Elongation	72	07:00	
Lagerung	4	∞	

**Tabelle 2.9:** PCR-Programm nach Haug (2002) zur Amplifizierung der LSU-Region (Primer: NL-1, NL-4) von den EM-Pilzproben aus Gülzow und Uppsala, Schweden.

Reaktion	Temperatur [°C]	Zeit [min]	Anzahl der Zyklen
Initiale Denaturierung	94	03:00	1
<b>Loop 1</b>			10 (touch down)
Denaturierung	94	00:30	
Variables Annealing	60-51	00:45	
Elongation	72	01:00	
<b>Loop 2</b>			25
Denaturierung	94	00:30	
Annealing	50	00:45	
Elongation	72	01:00	
Finale Elongation	72	07:00	
Lagerung	4	∞	

### 2.6.3 Agarosegel-Elektrophorese

Die Auftrennung der DNA-Produkte aus den PCR-Reaktionen (LSU und ITS) erfolgte mittels Agarosegel-Elektrophorese (Power Pac 300, BioRad, München) mit TAE-Puffer (1x) als Laufpuffer und Roti®-Safe GelStain (5 µl/100 ml TAE-Puffer) (Roth, Karlsruhe) zur anschließenden Fluoreszenz-Färbung der Nukleinsäuren. Es wurden 1,5%-ige Agarose- (Roti® Garose für die DNA/RNA Elektrophorese, Roth, Karlsruhe) Gele (1,5 g Agarose in 100 ml TAE-Puffer) mit PCR-Produkten, einer Positiv- (*Scleroderma bovista*) und Negativprobe (mit H<sub>2</sub>O<sub>dest</sub>) sowie einem DNA-Größenstandard (100 bp DNA-Leiter, Orange G, Peqlab Biotechnologie, Erlangen) beladen. Die PCR-Produkte wurden vor dem Befüllen der Geltaschen mit einem Ladepuffer (Loading Dye 6x, Fermentas, St. Leon-Roth) im Verhältnis 1 : 6 (Loading Dye: PCR-Produkt) vermischt. Die Laufzeit jeder Agarosegel-Elektrophorese betrug 60 min bei einer angelegten Spannung von 90 mV. Die Sichtbarmachung der DNA erfolgte mittels Gel-Dokumentationsanlage (UXT-30M-8E, Biostep, Wolfersstadt) bei  $\lambda=312$  nm und der photographischen Übersetzung mit dem Programm Argus X1 (3.2.20, Biostep, Wolfersstadt).

#### **2.6.4 Aufreinigung der PCR-Produkte und Sequenzierung der ITS- und LSU-Regionen**

Die PCR-Produkte, die im Agarosegel im zu erwartenden Größenbereich (etwa >680 bp mit dem Primerpaar ITS 1F/ITS 4 bzw. etwa 560 - 600 bp mit dem Primerpaar NL-1/NL-4) sichtbar wurden, wurden mittels dem peqGOLD Cyle Pure Kit (Peqlab Biotechnologie, Erlangen) von Proteinen und anderen inhibierenden, niedermolekularen Substanzen aufgereinigt. Zur Elution der DNA wurden je 50 µl Elutionspuffer verwendet.

Die Messung der DNA-Konzentration erfolgte mit Quant-iT<sup>FM</sup> (Invitrogen, Carlsbad, Kanada) Kit nach den Angaben des Herstellers mit dem Qubit<sup>TM</sup> Fluorometer. Die anschließende Sequenzierung wurde von der Firma SeqLab (Göttingen) durchgeführt.

#### **2.6.5 Identifikation der EM-Pilze mittels BLAST**

Die erhaltenen ITS- und LSU-Sequenzen (jeweils Vorwärts- und Rückwärtsstränge) wurden manuell mit BioEdit 7.1.3.0 (1997-2011, Hall) überarbeitet und die Sequenzen vor bzw. hinter den Primersequenzen gekürzt. Die editierten Sequenzen (Vorwärts-, Rückwärtsstränge) wurden auf der Seite des National Center for Biotechnology Information (NCBI) mittels BLAST (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>) (Altschul et al. 1990) auf Sequenzähnlichkeiten überprüft. Bei einer Übereinstimmung des untersuchten Pilzes von mind. 98% über die gesamte Sequenzlänge eines bekannten Pilzes wurde angenommen, dass es sich um einen pilzlichen Partner in der Ektomykorrhiza handelt. Betrug die Übereinstimmung 99% oder 100% über die gesamte Sequenzlänge war es sicher, dass der untersuchte Pilz der gleichen Art wie die in der Datenbank gespeicherten EM-Pilzart angehört (vgl. Hryniewicz et al. 2010).

### **2.7 Statistik**

Alle statistischen Analysen des Gefäßversuchs und der Feldversuche wurden mit dem Programm Statistica 7.0 (StatSoft Inc., 1984 – 2004) vorgenommen.

#### **2.7.1 Auswertung des Gefäßversuchs**

Die molekular-chemische Zusammensetzung der Blattproben des Gefäßversuchs wurde mittels Py-FIMS analysiert. Die Daten ( $n = 900$ ) dieser Analysen ( $m/z$  Signale) wurden mittels einer Diskriminanzanalyse klassifiziert. Um signifikante Unterschiede zu ermitteln wurde die Prüfgröße Wilks Lambda für jedes  $m/z$  im Bereich 15-900 berechnet. Als inverses Gütemaß



bedeuten hierbei kleinere Werte höhere Unterschiede der Gruppen. Mit 40 m/z Signalen, die die geringsten Werte aufwiesen, wurden t-Tests durchgeführt um signifikante Unterschiede zwischen den Varianten (Kontrolle, EM, R, EM+R) zu ermitteln. Die Unterschiede der selektierten 40 m/z wurden mittels Hauptkomponentenanalyse visualisiert. Weitere Informationen über die Py-FIMS Analyse sowie die statistische Auswertung ihrer Messwerte sind bei Schulten (1996) und Schlichting & Leinweber (2009) zu finden.

Die Effekte der EM-Besiedlung, der Rostpilzinfektion sowie ihrer Interaktion in Bezug auf die Konzentration der Phenole total, CT, SA und N wurden mit ein- bzw. zweifaktorieller Varianzanalyse (*analysis of variance*, ANOVA) ( $P < 0,05$ ) getestet. Signifikante Unterschiede zwischen den Varianten wurden mit *Fisher's least significant difference* (LSD) Test ermittelt. Zur statistischen Auswertung der SA-Konzentration der Versuchsvarianten wurde der Mann-Whitney U Test durchgeführt.

### **2.7.2 Auswertung der Feldversuche in den KUPs Gülzow und Uppsala**

Die Konzentrationen der chemischen Komponenten – CT, Chl<sub>a</sub>, SA – in den Blättern von Pappel- und Weidenklonen wurden mittels einfaktorieller ANOVA ( $P < 0,05$ ) ausgewertet. Die Bestimmung der signifikanten Unterschiede zwischen den Klonen erfolgte durch den *Tukey's honest significance* Test.

Beim Feldversuch Gülzow wurde zusätzlich die Interaktion zwischen Rostpilzanfälligkeit und Baumart in Bezug auf die chemischen Komponenten in den Pappel- und Weidenblättern mittels zweifaktorieller ANOVA ( $P < 0,05$ ) getestet. Signifikante Einflüsse auf einzelne Komponenten wurden durch *Tukey's honest significance* Test ermittelt.

Die EM-Besiedlung, der Anteil NM-Feinwurzeln, die EM-Diversität sowie die Rostpilzanfälligkeit der Pappel- und Weidenklone wurden mittels einfaktorieller ANOVA ( $P < 0,05$ ) getestet. Um die Interaktionen zwischen Baumart und Rostpilzanfälligkeit beim Feldversuch Gülzow zu prüfen, wurde eine zweifaktorielle ANOVA ( $P < 0,05$ ) durchgeführt. Signifikante Unterschiede zwischen den Klonen wurden mittels *Tukey's honest significance* Test determiniert.

Der Einfluss der Rostpilzanfälligkeit auf die EM Diversität in der KUP Gülzow wurde mit Hilfe eines zweiten Tests – einer Hauptkomponentenanalyse (PCA) - unter Einbeziehung der Boniturdaten 2011 der LFA Gülzow sowie der Pilzpartner-spezifischen EM-Raten visualisiert dargestellt.

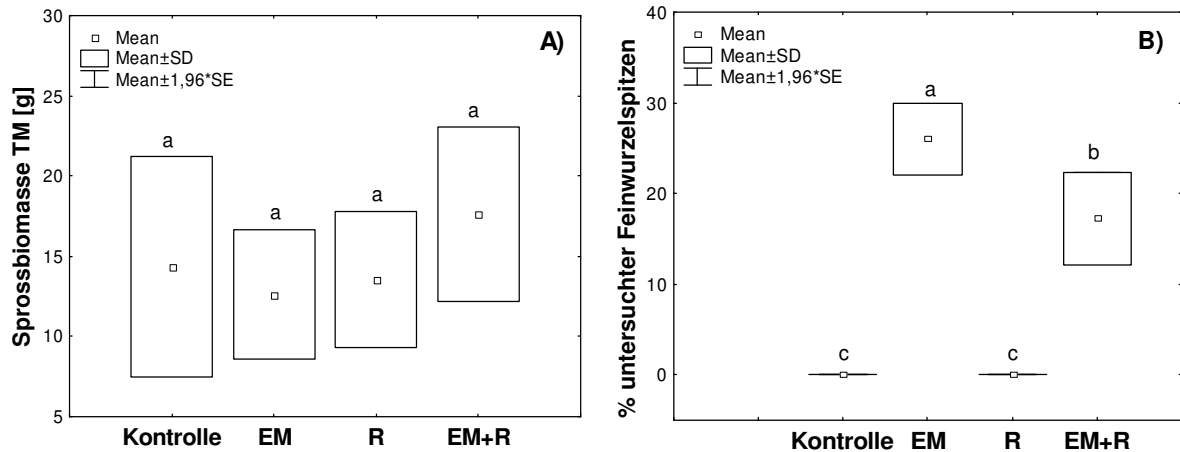
### 3. Ergebnisse

#### 3.1 Gefäßversuch

Mit dem Ziel der Untersuchung auf mögliche Interaktionen von Mykorrhizierung und Rostpilzinfektion an Pappeln wurde im Gefäßversuch ein Pappelklon (*P. trichocarpa* Torr. and Gray × *P. deltoides* Bartr. ex Marsh. cv. Beaupré) als Modellorganismus mit jeweils einem EM-Pilzstamm (*Hebeloma mesophaeum* (Pers.) Quélet Stamm MÜN) und/oder einem Rostpilzstamm (*Melampsora larici-populina* Kleb. Isolat 98AG31, Moÿ-de-l'Aisne, Frankreich) inokuliert, um die Wirkung der Besiedlung durch einen Pilzstamm bzw. beide Pilzstämme auf Wachstum und chemische Parameter in den Blättern zu überprüfen.

##### 3.1.1 EM-Rate und chemische Zusammensetzung von Blättern des Gefäßversuchs

Die Sprossbiomasse variierte zwischen 12,6 g ( $\pm 4,0$ ) und 17,6 g ( $\pm 5,4$ ) TM ohne signifikante Unterschiede zwischen den Varianten (Abb. 3.1A). Eine Ektomykorrhizierung wurde nur an zuvor inokulierten Pflanzen mit und ohne Rostpilzinfektion ausgebildet. Die EM-Rate der Feinwurzeln war in der EM-Variante ohne Rostpilzinfektion ( $26 \% \pm 4 \%$  der untersuchten Feinwurzelspitzen) signifikant höher als in der EM-Variante mit Rostpilzinfizierten Blättern ( $17\% \pm 5\%$  der untersuchten Feinwurzelspitzen) (Abb. 3.1B).



**Abbildung 3.1:** Box Plots der Sprossbiomasse (A) und prozentualen EM-Besiedlung (B) der Feinwurzeln vier Monate alter Pappeln (*P. trichocarpa* × *deltoides* 'Beaupré') mit unterschiedlichen Varianten: Kontrollpflanzen ohne Behandlung (Kontrolle), EM Pappeln (EM), Rostpilz-infizierte Pappeln (R) sowie ihre Interaktion (EM+R). Angegeben sind Mittelwerte mit Standardabweichung (SD) und Standardfehler (SE);  $n = 4$ ; unterschiedliche Buchstaben in den Box Plots bezeichnen signifikante Unterschiede zwischen den Varianten ( $P < 0,05$ ).

Die Phenolkonzentration (total) in den Blättern der Rostpilz-Variante war signifikant niedriger als in allen anderen Varianten (Tab. 3.1). Die CT-Konzentration in den Blättern wies keine signifikanten, variantenspezifischen Unterschiede auf. Jedoch war der Anteil der CT an den Phenolen (total) in den inokulierten (EM und/oder R) Varianten signifikant höher als in den nicht inokulierten Varianten.

Die SA-Konzentration in den Blättern war sowohl in der Rostpilz-Variante mit als auch in der Rostpilz-Variante ohne EM-Besiedlung signifikant höher als in den Varianten ohne Rostpilz-Infektion (Tab. 3.2). Auch die N-Konzentration war in der Rostpilz- und in der Kontroll-Variante signifikant höher als in der EM-Variante.

**Tabelle 3.1:** Konzentration chemischer Komponenten in den Blättern vier Monate alter Pappeln (*Populus trichocarpa* × *deltoides* 'Beaupré') mit unterschiedlichen Varianten: Kontrollpflanzen ohne Behandlung (Kontrolle), EM Pappeln (EM), Rostpilz-infizierte Pappeln (R) sowie ihre Interaktion (EM+R). Angegeben sind Mittelwerte mit STABW in Klammern;  $n = 4$ ; verschiedene Buchstaben innerhalb einer Zeile bezeichnen signifikante Unterschiede ( $P < 0,05$ ) zwischen den Varianten. (Pfabel et al. 2012)

Chemische Komponenten der Pappelblätter	Varianten			
	Kontrolle	EM	R	EM+R
Phenole total (mg g <sup>-1</sup> )	97,8 (18,4) <sup>b</sup>	97,3 (12,7) <sup>b</sup>	78,9 (18,9) <sup>a</sup>	99,8 (20,2) <sup>b</sup>
Kondensierte Tannine (mg g <sup>-1</sup> )	12,5 (3,0) <sup>a</sup>	18,4 (3,6) <sup>a</sup>	14,8 (4,4) <sup>a</sup>	17,5 (6,1) <sup>a</sup>
Anteil kondensierter Tannine an den Phenolen total (%)	12,8 (2,9) <sup>a</sup>	18,9 (1,1) <sup>b</sup>	18,8 (0,4) <sup>b</sup>	17,5 (1,2) <sup>b</sup>
Salizylsäure (µg g <sup>-1</sup> )	6,8 (3,6) <sup>a</sup>	4,6 (4,5) <sup>a</sup>	17,9 (10,6) <sup>b</sup>	25,4 (11,5) <sup>b</sup>
N (mg g <sup>-1</sup> )	12,0 (0,1) <sup>b</sup>	11,0 (0,0) <sup>a</sup>	12,0 (0,1) <sup>b</sup>	11,0 (0,1) <sup>a</sup>

**Tabelle 3.2:** Effekte der EM-Besiedlung (EM), Rostpilzinfektion (R) sowie ihrer Interaktion (EM × R) auf die Konzentration der Phenole total, kondensierten Tannine, Salizylsäure und N bei vier Monate alten Pappelblättern (*Populus trichocarpa* × *deltoides* 'Beaupré'); zweifaktorielle ANOVA ( $P < 0,05$ ). (Pfabel et al. 2012)

Quelle	DF	F	P
<b>Phenole total</b>			
EM	1	0,314	0,590
R	1	0,011	0,918
EM × R	1	0,140	0,718
Error	12		
<b>Kondensierte Tannine</b>			
EM	1	1,052	0,335
R	1	0,390	0,549
EM × R	1	1,243	0,297
Error	12		
<b>Salizylsäure</b>			
EM	1	2,891	0,114
R	1	27,093	<0,001
EM × R	1	3,468	0,087
Error	12		
<b>N</b>			
EM	1	0,305	0,590
R	1	0,168	0,689
EM × R	1	0,176	0,682
Error	12		

### **3.1.2 Molekular-chemische Zusammensetzung der Pappelblätter des Gefäßversuchs**

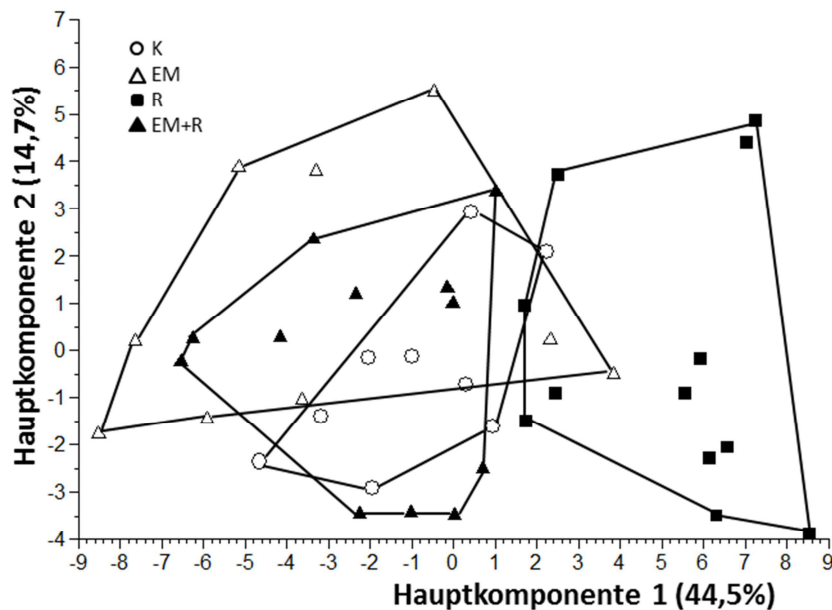
Die molekular-chemische Zusammensetzung der Pappelblätter wurde in 10 Stoffklassen organischer Verbindungen unterteilt: Kohlenhydrate, Phenole und Ligninmonomere, Lignindimere, Lipide wie Alkane, Alkene, N-Alkylester und N-Alkyldiester Lipide, Alkylaromate, N-haltige Verbindungen, Sterole, Peptide, Suberine und Fettsäuren (Tab. 3.3). Hierbei wies der Anteil an Kohlenhydraten in der EM-Variante im Vergleich zur Kontrolle eine signifikante Erhöhung auf. Weiterhin waren in allen inokulierten Varianten die Anteile der Sterole und Suberine in den Blättern signifikant höher als in der Kontroll-Variante. In den Konzentrationen der übrigen Stoffklassen bestanden keine signifikanten Unterschiede zwischen den Varianten.

**Tabelle 3.3:** Flüchtige Bestandteile (VM, %), Gesamtionenintensität (TII) und Intensitäten wichtiger Stoffklassen ( $10^6$  Ionen pro mg Probe) in den Blättern von *Populus trichocarpa* × *deltoides* 'Beaupré' (4 Monate alt) mit unterschiedlichen Varianten: Kontrolle, EM-Inokulation (EM) und Rostpilzinfektion (R) sowie ihre Kombination (EM+R). Angegeben sind Mittelwerte und ihre STABW,  $n = 4$ . Unterschiedliche Buchstaben innerhalb der Zeilen bezeichnen signifikante Unterschiede ( $P < 0,05$ ) zwischen den Varianten. (Pfabel et al. 2012)

Merkmal	Variante			
	Kontrolle	EM	R	EM+R
<b>VM</b>	80,7	83,0	81,5	80,7
<b>TII</b>	436,6	533,1	483,0	461,7
<b>Stoffklasse</b>				
CARB	45,8 (6,0) <sup>a</sup>	61,5 (14,0) <sup>b</sup>	51,8 (15,4) <sup>a</sup>	46,8 (7,5) <sup>a</sup>
PHLM	38,3 (8,2) <sup>a</sup>	46,1 (5,0) <sup>a</sup>	39,9 (8,1) <sup>a</sup>	38,3 (7,1) <sup>a</sup>
LDIM	9,9 (2,3) <sup>a</sup>	10,3 (3,3) <sup>a</sup>	8,7 (2,1) <sup>a</sup>	12,1 (2,8) <sup>a</sup>
LIPID	42,4 (15,7) <sup>a</sup>	54,0 (15,4) <sup>a</sup>	45,1 (17,6) <sup>a</sup>	50,3 (16,7) <sup>a</sup>
ALKYL	30,7 (7,0) <sup>a</sup>	37,4 (5,7) <sup>a</sup>	31,4 (7,2) <sup>a</sup>	31,7 (5,4) <sup>a</sup>
NCOMP	23,9 (5,7) <sup>a</sup>	26,4 (6,1) <sup>a</sup>	24,5 (6,4) <sup>a</sup>	24,0 (4,9) <sup>a</sup>
STER	12,2 (4,1) <sup>a</sup>	18,4 (1,7) <sup>b</sup>	17,9 (6,9) <sup>ab</sup>	16,4 (4,4) <sup>ab</sup>
PEPT	21,2 (2,7) <sup>a</sup>	24,5 (2,9) <sup>a</sup>	23,1 (4,3) <sup>a</sup>	20,6 (1,4) <sup>a</sup>
SUBE	1,2 (0,3) <sup>a</sup>	1,7 (0,3) <sup>b</sup>	1,6 (0,7) <sup>ab</sup>	1,6 (0,4) <sup>ab</sup>
FATTY	9,2 (5,0) <sup>a</sup>	10,9 (1,6) <sup>a</sup>	10,8 (2,4) <sup>a</sup>	9,7 (3,7) <sup>a</sup>

CARB: Kohlenhydrate, PHLM: Phenole und Ligninmonomere, LDIM: Lignindimere, LIPID: Alkane, Alkene, N-Alkylester, N-Alkyldiester Lipide, ALKYL: Alkylaromaten, NCOMP: N-haltige Verbindungen, STER: Sterole, PEPT: Peptide, SUBE: Suberine, FATTY: Fettsäuren n-C<sub>16</sub> bis n-C<sub>34</sub>

Mittels Diskriminanzanalyse konnte die Rostpilzvariante von den übrigen drei Varianten (Kontrolle, EM, EM+R) weitgehend getrennt werden (Abb. 3.2), wobei letztere zusammen clusterten. Die Kontroll- sowie die EM-Variante überlappten jedoch leicht mit der Rostpilzvariante, wohingegen die EM+R-Variante deutlich von der Rostpilzvariante getrennt war.



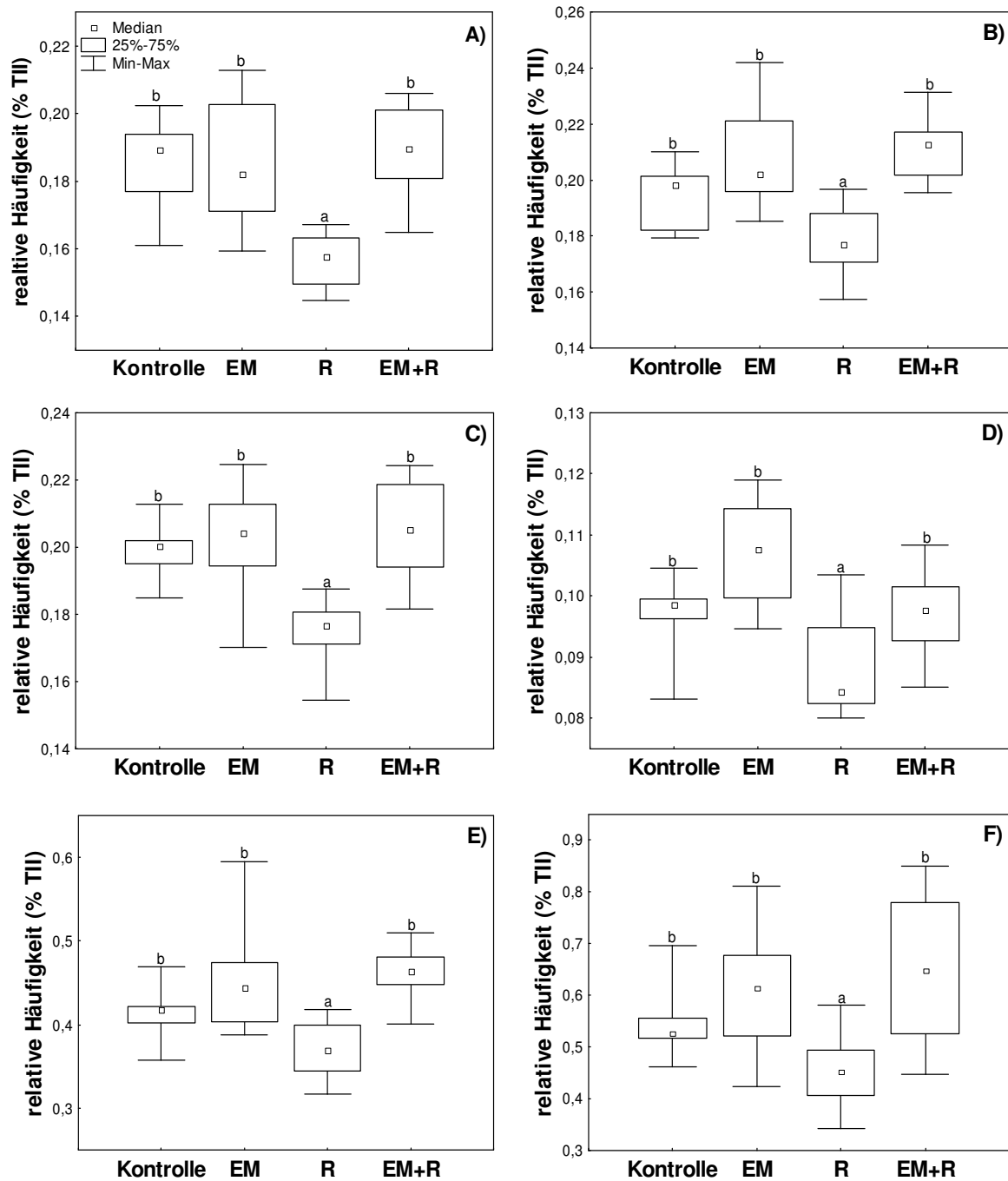
**Abbildung 3.2:** Score Plot der Hauptkomponenten 1 vs. 2 einer Diskriminanzanalyse basierend auf der molekular-chemischen Zusammensetzung der *Populus trichocarpa* × *deltoides* 'Beaupré' Blätter: Kontrolle, EM, Rostpilzinfektion (R) und ihre Kombination (EM+R). (Pfabel et al. 2012)

Die Abgrenzung der Rostpilzvariante basierte auf signifikanten Unterschieden in den Signalmarkern: Flavonoide ( $m/z$  308, 298, 300, 268, 270) und Lipid ( $m/z$  392: Cyclooctacosan). Diese ergaben positive Werte in der Hauptkomponente 1 (siehe Abb. 3.2). Diese Signalmarker wurden den entsprechenden Verbindungen zugeordnet und in Tab. 3.4 dargestellt. Die betreffenden Flavonoide konnten in ein Flavanol (Catechinhydrat), vier Flavone (5-hydroxy-4',7-dimethoxyflavone, trihydroxy-methoxyflavone, 5-hydroxy-7-methoxyflavone, 5,4',7-trihydroxyflavone) und ein Flavanon gegliedert werden; das  $m/z$  Verhältnis 270 konnte sowohl zu 5,4',7-Trihydroxyflavon als auch zu Pinostrobinchalcon zugeordnet werden. Die relativen Häufigkeiten der Signalmarker wurden mittels Box Plots dargestellt (Abb. 3.3). Die Rostpilzvariante wies im Vergleich zu den anderen drei Varianten (Kontrolle, EM, EM+R) signifikant niedrigere relative Häufigkeiten der Signalmarker auf. Zwischen EM-Variante und Kontrolle bestanden in den relativen Häufigkeiten der Signalmarker keine signifikanten Unterschiede.

**Tabelle 3.4:** Elementare Zusammensetzung der am häufigsten diskriminierenden Masse/Ladung (m/z) Verhältnisse (aufgelistet in absteigender Reihenfolge) der hochauflösenden Py-FIMS Analysen und ihre Zuordnung zu einer molekularen Formel und ihren Stoffklassen. (Pfabel et al. 2012)

m/z gemessen	m/z kalkuliert	Formel	Verbindung	Stoffklasse
308,091	308,090	C <sub>15</sub> H <sub>16</sub> O <sub>7</sub>	Catechinhydrat	Flavonoid (Flavanol)
298,096	298,084	C <sub>17</sub> H <sub>14</sub> O <sub>5</sub>	5-Hydroxy-4',7-Dimethoxyflavon	Flavonoid (Flavon)
300,068	300,063	C <sub>16</sub> H <sub>12</sub> O <sub>6</sub>	Trihydroxy-Methoxyflavon	Flavonoid (Flavon)
392,429	392,438	C <sub>28</sub> H <sub>56</sub>	Cyclooctacosan	Lipid (Alkan)
268,067	268,074	C <sub>16</sub> H <sub>12</sub> O <sub>4</sub>	5-Hydroxy-7-Methoxyflavone	Flavonoid (Flavon)
270,055	270,053	C <sub>15</sub> H <sub>10</sub> O <sub>5</sub>	5,4',7-Trihydroxyflavone	Flavonoid (Flavon)
270,084	270,089	C <sub>16</sub> H <sub>14</sub> O <sub>4</sub>	Pinostrobinchalcon	Flavonoid (Flavanon)





**Abbildung 3.3:** Box Plots der relativen Häufigkeiten (prozentualer Anteil der totalen Ionenintensität, %TII) der Blattkomponenten mit den Masse/Ladung (m/z) Verhältnissen (A) 308, (B) 298, (C) 300, (D) 392, (E) 268 und (F) 270 der hochauflösenden Pyrolyse-Feldionisation Massenspektrometrie (Py-FIMS) in den Pappelblättern (*Populus trichocarpa* × *deltoides* 'Beaupré') unterschiedlicher Varianten: Kontrolle, EM, Rostpilz-infiziert (R) und ihre Kombination (EM+R). Unterschiedliche Buchstaben in den Box Plots bezeichnen signifikante Unterschiede zwischen den Varianten ( $P < 0,05$ ). (Pfabel et al. 2012)

### 3.2 Feldversuche an den Standorten Gülzow und Uppsala

Die Feldversuche in Gülzow (Deutschland) und Uppsala (Schweden) zielten darauf ab, den Zusammenhang zwischen EM-Rate bzw. EM-Diversität und Rostpilzanfälligkeit von Weiden- und Pappelklonen in Gülzow zu testen. In der KUP Gülzow wurden hierfür interspezifische Pappel- und Weidenklone untersucht, während in der KUP Uppsala intraspezifische *S. viminalis* Klone zur Analyse ausgewählt wurden. Die Bodeneigenschaften der KUP Gülzow wurden wie folgt gemessen:  $\text{pH}_{\text{CaCl}_2}$  6,1,  $\text{C}_{\text{org}}$  7,1 g kg<sup>-1</sup>,  $\text{N}_t$  0,8 g kg<sup>-1</sup>. Der Boden der KUP Uppsala zeigte folgende Eigenschaften:  $\text{pH}_{\text{CaCl}_2}$  7,3,  $\text{C}_{\text{org}}$  31 g kg<sup>-1</sup>,  $\text{N}_t$  2,2 g kg<sup>-1</sup>.

#### 3.2.1 Chemische Zusammensetzung der Blätter von Pappel- und Weidenklonen

Die N-Konzentration in den Blättern der Pappel- und Weidenklone (KUP Gülzow) zeigte keine signifikanten Unterschiede und variierte zwischen 16,4 mg N g<sup>-1</sup> TM (Pappelklon Beaupré) und 26,2 mg N g<sup>-1</sup> TM (Pappelklon Raspalje). Die übrigen Pappel- und Weidenklone der KUP Gülzow wiesen folgende Mittelwerte auf: Muhle Larsen: 23,7 mg g<sup>-1</sup>; Max 2: 24,7 mg g<sup>-1</sup>; Max 3: 24,5 mg g<sup>-1</sup>; Max 4: 19,9 mg g<sup>-1</sup>; 78021: 24,9 mg g<sup>-1</sup>; *Salix viminalis*: 25,2 mg g<sup>-1</sup>; *Salix* × *dasyclados*: 19,5 mg g<sup>-1</sup>; 78183: 21,3 mg g<sup>-1</sup>; Weide 6 und Weide 8: jeweils 23,0 mg g<sup>-1</sup>; 78101: 22,6 mg g<sup>-1</sup>.

Die Konzentration der CT im Blatt lag im Allgemeinen bei den Weidenklonen höher als bei den Pappelklonen. Die signifikant höchste CT-Konzentration in den Blättern wurde beim Weidenklon 78021 (206,7 mg g<sup>-1</sup>) gemessen. Die Klone Raspalje, Max 2 und Max 4 wiesen signifikant niedrigere Konzentrationen auf.

In den Blättern von *Salix* × *dasyclados* lag die signifikant höchste SA-Konzentration der untersuchten Klone vor (21,9 µg g<sup>-1</sup>). Die niedrigste SA-Konzentration wurde in den Blättern des Pappelklons Beaupré (8,7 µg g<sup>-1</sup>) gemessen.

*Salix* × *dasyclados* (1,3 µg mg<sup>-1</sup> TM Blatt) wies bei der Messung der Chl<sub>a</sub>-Konzentration hingegen den niedrigsten Wert im Vergleich zu den übrigen Pappel- und Weidenklonen auf. Der höchste Wert wurde bei Max 3 (3,1 µg mg<sup>-1</sup>) detektiert (Tab. 3.5).

**Tabelle 3.5:** Konzentrationen chemischer Komponenten der Blätter von Pappel- und Weidenklonen aus der KUP Gülzow.  $n = 4$ , unterschiedliche Buchstaben bezeichnen signifikante Unterschiede ( $P < 0,05$ ).

Chemische Blattparameter	Muhle Larsen	Raspalje	Beaupré	Max 2	Max 3	Max 4	78183	<i>Salix</i> × <i>dasyclados</i>	Weide 8	78021	78101	<i>Salix</i> <i>viminalis</i>	Weide 6
Kondensierte Tannine (mg g <sup>-1</sup> )	78,0 (23,7) <sup>abc</sup>	46,2 (11,2) <sup>a</sup>	52,5 (4,9) <sup>ab</sup>	38,5 (16,9) <sup>a</sup>	62,7 (49,3) <sup>ab</sup>	32,0 (9,7) <sup>a</sup>	92,4 (10,0) <sup>abc</sup>	89,4 (13,8) <sup>abc</sup>	185,7 (118,1) <sup>bc</sup>	206,7 (132,2) <sup>c</sup>	141,0 (13,9) <sup>abc</sup>	111,6 (18,4) <sup>abc</sup>	131,7 (68,0) <sup>abc</sup>
Salizylsäure (µg g <sup>-1</sup> )	12,0 (2,2) <sup>bcd</sup>	9,5 (0,6) <sup>ab</sup>	8,7 (2,0) <sup>a</sup>	9,5 (4,1) <sup>ab</sup>	10,3 (2,2) <sup>abc</sup>	8,6 (2,1) <sup>ab</sup>	14,6 (1,7) <sup>cd</sup>	21,9 (1,8) <sup>f</sup>	20,2 (1,6) <sup>ef</sup>	8,6 (1,4) <sup>ab</sup>	15,8 (1,4) <sup>de</sup>	11,9 (1,4) <sup>bcd</sup>	10,6 (0,3) <sup>abc</sup>
Chl <sub>t</sub> (µg mg <sup>-1</sup> )	2,5 (0,7) <sup>ab</sup>	2,8 (1,1) <sup>ab</sup>	1,7 (0,5) <sup>ab</sup>	2,1 (0,3) <sup>ab</sup>	3,1 (0,6) <sup>b</sup>	2,3 (0,4) <sup>ab</sup>	2,5 (0,5) <sup>ab</sup>	1,3 (0,6) <sup>a</sup>	2,2 (0,7) <sup>ab</sup>	3,1 (0,7) <sup>b</sup>	2,0 (0,8) <sup>ab</sup>	2,5 (1,1) <sup>ab</sup>	2,3 (0,6) <sup>ab</sup>

Die Konzentrationen der ausgewählten chemischen Blattkomponenten (N, CT, SA und  $\text{Chl}_t$ ) der *S. viminalis* Klone (KUP Uppsala) wiesen keine signifikanten, intraspezifischen Unterschiede auf (Tab. 3.6). Die N-Konzentration der Blätter variierte zwischen min. 18,6 mg N g<sup>-1</sup> TM (Ulv) und max. 20,7 mg N g<sup>-1</sup> TM (Gustav). Bei den übrigen Klonen wurden folgende Werte gemessen: Jorr: 18,9 mg g<sup>-1</sup>; 78183: 20,2 mg g<sup>-1</sup>; Rapp: 19,5 mg g<sup>-1</sup>; Orm: 19,8 mg g<sup>-1</sup>.

**Tabelle 3.6:** Konzentrationen chemischer Blattkomponenten in sechs *S. viminalis* Klonen aus einer KUP in Uppsala, Schweden.  $n = 4$ , es liegen keine signifikanten Unterschiede ( $P < 0,05$ ) vor.

Chemische Parameter der Weidenblätter	Gustav	Jorr	78183	Rapp	Orm	Ulv
Kondensierte Tannine (mg g <sup>-1</sup> )	232,1 (67,2)	190,5 (68,3)	186,5 (53,0)	186,9 (35,9)	169,7 (48,2)	210,4 (51,0)
Salizylsäure (µg g <sup>-1</sup> )	5,4 (1,4)	4,7 (0,9)	5,0 (1,6)	4,3 (0,6)	4,6 (0,5)	4,1 (0,8)
$\text{Chl}_t$ (µg mg <sup>-1</sup> )	1,6 (0,4)	1,9 (0,7)	2,1 (0,5)	1,9 (0,7)	1,7 (0,4)	1,7 (0,2)

### 3.2.2 EM-Rate und EM-Diversität der Pappel- und Weidenklone in den KUPs Gülzow und Uppsala

Die untersuchten Pappelklone wiesen durchgängig höhere EM-Raten der Feinwurzeln (70,7% und 80,7%) als die Weidenklone (18,0% und 36,7%) auf. Innerhalb der Pappelklone waren die Klone Raspalje (70,7%) und Max 4 (80,7%) im Vergleich zu den übrigen Pappelklonen signifikant stärker mykorrhiziert. Weitere signifikante Unterschiede in der EM-Rate der Feinwurzeln bestanden auch innerhalb der Weidenklone zwischen Klon 78183 (36,7%), Klon Weide 8 (18,0%) und Klon 78021 (19,8%) (siehe Tab.3.8).

Mit Hilfe der morphologisch-anatomischen Bestimmung konnten die EM-Feinwurzeln (KUP Gülzow) sechs verschiedenen Morphotypen zugeordnet werden. Die molekularbiologisch identifizierten Pilzpartner der EM-Morphotypen sind in Tab. 3.7 (siehe auch Anhang A3) dargestellt. Sie basieren auf insg. 36 sequenzierten PCR-Produkten, die eine Fragmentlänge von 87 bp bis 901 bp aufwiesen.

**Tabelle 3.7:** Beschreibung der EM-Morphotypen und ihrer identifizierten EM-Pilzpartner an Weiden- und Pappelklonen der KUP Gölzow.

Morphotyp	Beschreibung	Identifizierte EM-Pilze
1	unverzweigt unverzweigte Enden: bräunlich, Spitzen auch abziehende, verzweigte Hyphen äußere Mantelschicht: pseudoparenchymatisch	<i>Scleroderma fuscum</i> , <i>Scleroderma bovista</i>
2	unverzweigt, monopodial-pinnat unverzweigte Enden: weißlich, Spitzen auch abziehende, verzweigte Hyphen äußere Mantelschicht: pseudoparenchymatisch	<i>Scleroderma fuscum</i> , <i>Scleroderma bovista</i>
3	monopodial-pinnat unverzweigte Enden: weißlich, Spitzen bräunlich abziehende, verzweigte Hyphen äußere Mantelschicht: pseudoparenchymatisch	<i>Scleroderma fuscum</i> , <i>Scleroderma bovista</i>
4	unverzweigt unverzweigte Enden: ocker, gelblich-braun, Spitzen bräunlich abziehende, verzweigte Hyphen äußere Mantelschicht: pseudoparenchymatisch	<i>Inocybe</i> spp.
5	unverzweigt unverzweigte Enden: dunkelbraun, Spitzen orange abziehende, verzweigte Hyphen äußere Mantelschicht: pseudoparenchymatisch	<i>Russula</i> spp.
6	unverzweigt unverzweigte Enden: dunkelbraun, Spitzen auch abziehende, verzweigte Hyphen äußere Mantelschicht: pseudoparenchymatisch	<i>Russula</i> spp. <i>Tomentella</i> spp. Pezizales

Die Pilzpartner von drei EM-Morphotypen konnten bis auf Gattungsebene bestimmt werden; die Pilzpartner von zwei weiteren EM-Morphotypen bis auf Artebene. In Morphotyp 6 wurden sowohl die Gattungen *Tomentella* und *Russula* als auch Pilzpartner der Ordnung Pezizales nachgewiesen. Dieser Morphotyp wurde ausschließlich bei *Salix* × *dasyclados* (1,5% der untersuchten Feinwurzelspitzen) gefunden. Die Anzahl unterschiedlicher EM-Morphotypen variierte bei den Pappel- und Weideklonen zwischen vier und sechs Morphotypen.

In Tab. 3.8 ist die EM-Diversität an den Feinwurzeln der Pappel- und Weidenklone dargestellt. Sowohl bei den Pappel- als auch bei den Weidenklonen trat *Inocybe* spp. als dominanter EM-Pilzpartner auf; seine Häufigkeit variierte zwischen 12,8% und 41,8% der untersuchten Feinwurzeln bei Pappelklonen und 2,2% - 17,7% der untersuchten Feinwurzeln bei Weidenklonen. Am häufigsten wurde *Inocybe* spp. an den Feinwurzeln von Max 4 (41,8%

## Ergebnisse

der untersuchten Feinwurzeln) nachgewiesen. An den Feinwurzeln der Weidenklone 78021 (2,2%) und Weide 8 (3%) war sein Vorkommen am geringsten.

**Tabelle 3.8:** Gesamte EM-Raten (% der untersuchten Feinwurzelspitzen) und Pilzpartner-spezifische EM-Raten (% der untersuchten Feinwurzelspitzen) von Pappel- und Weidenklonen aus der KUP Gülzow. *Tomentella* spp. und *Russula* spp. wurden auf Grund ihres Morphotyps zusammengefasst.  $n = 4$ , unterschiedliche Buchstaben bezeichnen signifikante Unterschiede ( $P < 0,05$ ).

EM-Pilze	Muhle Larsen	Raspalje	Beaupré	Max 2	Max 3	Max 4	78183	<i>Salix</i> × <i>dasyclados</i>	Weide 8	78021	78101	<i>Salix</i> <i>viminalis</i>	Weide 6
EM [%]	75,3 <sup>ef</sup>	70,7 <sup>e</sup>	75,7 <sup>ef</sup>	75,6 <sup>ef</sup>	74,5 <sup>ef</sup>	80,7 <sup>f</sup>	36,7 <sup>d</sup>	30,3 <sup>bcd</sup>	18 <sup>a</sup>	19,8 <sup>a</sup>	20,6 <sup>ab</sup>	33,2 <sup>cd</sup>	24,1 <sup>abc</sup>
<i>Inocybe</i> spp. [%]	12,8 <sup>abc</sup>	27,8 <sup>cde</sup>	35,4 <sup>de</sup>	24,4 <sup>bcde</sup>	16,4 <sup>abcd</sup>	41,8 <sup>e</sup>	10,5 <sup>abc</sup>	13,4 <sup>abc</sup>	3 <sup>a</sup>	2,2 <sup>a</sup>	16 <sup>abcd</sup>	17,7 <sup>abcd</sup>	5,5 <sup>ab</sup>
<i>Scleroderma</i> <i>bovista</i> [%]	16,2 <sup>cd</sup>	21,6 <sup>d</sup>	0 <sup>a</sup>	0 <sup>a</sup>	11,3 <sup>bc</sup>	0 <sup>a</sup>	1 <sup>a</sup>	0 <sup>a</sup>	<1,0 <sup>a</sup>	0 <sup>a</sup>	0 <sup>a</sup>	0 <sup>a</sup>	3,3 <sup>ab</sup>
<i>Scleroderma</i> <i>fuscum</i> [%]	17,3 <sup>a</sup>	6,2 <sup>a</sup>	17,4 <sup>a</sup>	15,4 <sup>a</sup>	21,3 <sup>a</sup>	14,2 <sup>a</sup>	4,6 <sup>a</sup>	1,2 <sup>a</sup>	11,5 <sup>a</sup>	5,9 <sup>a</sup>	1 <sup>a</sup>	3,6 <sup>a</sup>	9,6 <sup>a</sup>
<i>Tomentella</i> spp./ <i>Russula</i> spp. [%]	16,8 <sup>ab</sup>	8,1 <sup>ab</sup>	17,8 <sup>ab</sup>	26,4 <sup>b</sup>	11,7 <sup>ab</sup>	22,4 <sup>ab</sup>	20,2 <sup>ab</sup>	14,2 <sup>ab</sup>	3 <sup>a</sup>	11 <sup>ab</sup>	3,6 <sup>a</sup>	11,9 <sup>ab</sup>	5 <sup>ab</sup>
Pezizales	-	-	-	-	-	-	-	1,5 <sup>a</sup>	-	-	-	-	-
<i>Russula</i> spp. [%]	12,2 <sup>bc</sup>	7 <sup>abc</sup>	5,1 <sup>abc</sup>	9,4 <sup>abc</sup>	13,8 <sup>c</sup>	2,3 <sup>abc</sup>	<1,0 <sup>ab</sup>	0 <sup>a</sup>	0 <sup>a</sup>	<1,0 <sup>ab</sup>	0 <sup>a</sup>	0 <sup>a</sup>	<1,0 <sup>ab</sup>

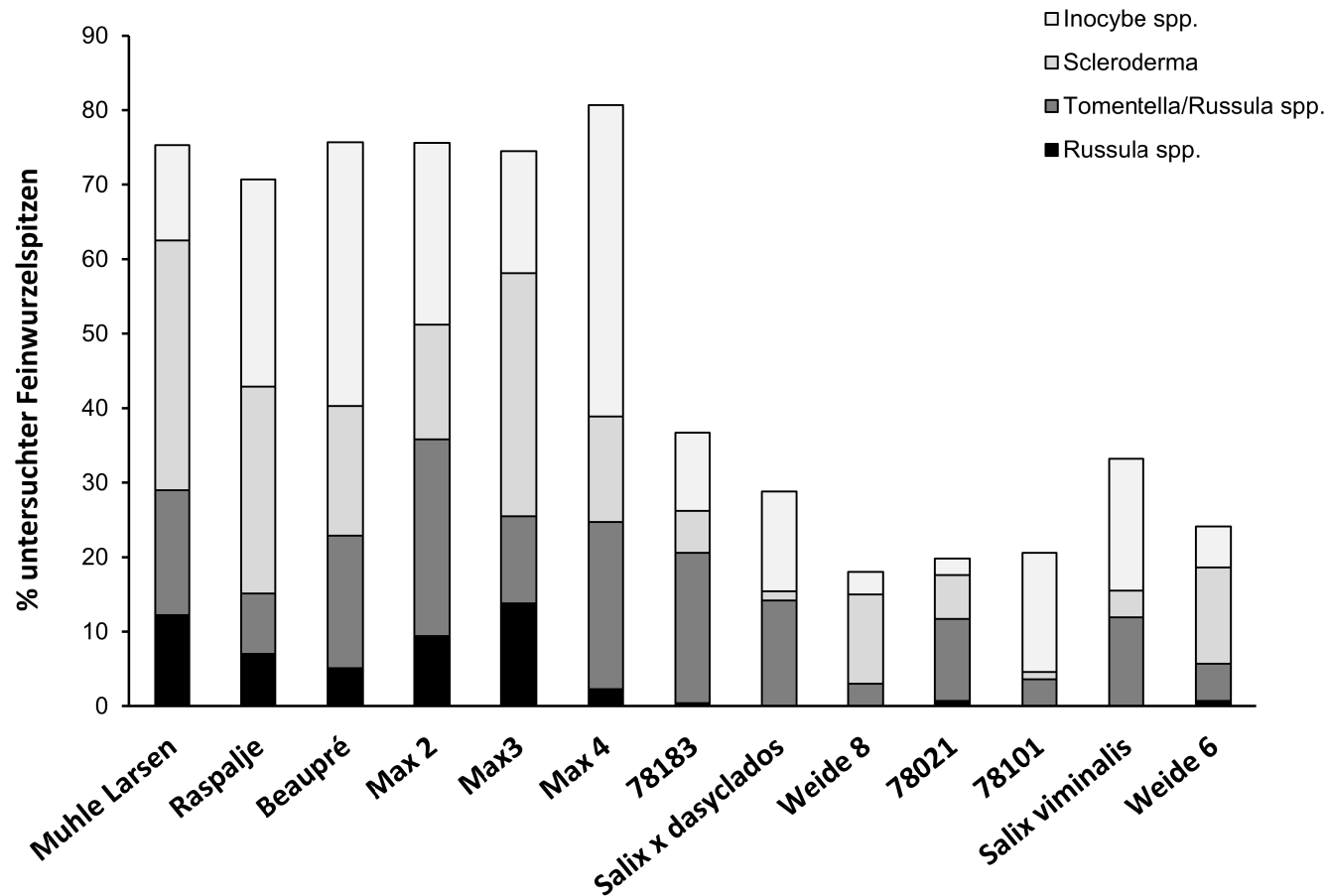
*Scleroderma bovista* war bei Raspalje mit 21,6% der untersuchten Feinwurzelspitzen der häufigste EM-Partner, während diese Pilzart bei den Klonen Weide 8 (0,5% der untersuchten Feinwurzelspitzen) und 78183 (1% der untersuchten Feinwurzelspitzen) nur in geringer Besiedlungsdichte auftrat. An den Wurzeln der Pappelklone Beaupré, Max 2 und Max 4 sowie der Weidenklone *Salix* × *dasyclados*, 78021, 78101 und *Salix viminalis* konnte *S. bovista* nicht nachgewiesen werden.

*Scleroderma fuscum* trat hingegen bei allen Klonen ohne signifikante, interspezifische Unterschiede auf (1,0% - 21,3% der untersuchten Feinwurzelspitzen).

Der kombinierte Morphotyp *Tomentella* spp./*Russula* spp. konnte ebenso bei allen Klonen nachgewiesen werden. Bei den Weidenklonen trat dieser Morphotyp neben *Inocybe* spp. als dominanter EM-Morphotyp auf. Seine Häufigkeit variierte zwischen 3,0% (Weide 8; 78101: 3,6% der untersuchten Feinwurzelspitzen) und 20,2% der untersuchten Feinwurzelspitzen der Weidenklone. Unter den Pappelklonen konnte dieser Morphotyp bei Max 2 (26,4% der untersuchten Feinwurzelspitzen) am häufigsten detektiert werden.

*Russula* spp. waren am stärksten an den Feinwurzeln von Max 3 (13,8% der untersuchten Feinwurzelspitzen) verbreitet und hier der häufigste Pilzpartner in der Ektomykorrhizierung. Unter den Weidenklonen wurden *Russula* spp. nur an den Feinwurzeln der Klone 78183, 78021 und Weide 6 gefunden (Tab. 3.8, Abb. 3.4).





**Abbildung 3.4:** Relative Häufigkeit der identifizierten EM-Morphotypen (% der untersuchten Feinwurzelspitzen) bei Pappel- und Weidenklonen der KUP Gülzow. Die EM-Pilze wurden hier auf Gattungsebene dargestellt. *Scleroderma fuscum* und *Scleroderma bovista* wurden zur Gattung *Scleroderma* zusammengefasst. Pezizales (an *S. x dasyclados*) wurde nicht dargestellt.

Zwischen den sechs *S. viminalis* Klonen der KUP Uppsala bestanden keine signifikanten Unterschiede in der EM-Rate der Feinwurzeln. Der Schwankungsbereich lag zwischen 4,8% (Orm) und 18,6% (78183) der untersuchten Feinwurzelspitzen. Rostpilz-anfällige und -resistente Klone wiesen keine signifikant unterschiedlichen EM-Raten auf (Tab. 3.10).

An den Feinwurzeln der *S. viminalis* Klone auf der KUP Uppsala konnten fünf EM-Morphotypen nachgewiesen (Tab. 3.9) und die entsprechenden EM-Pilzpartner durch Analyse der ITS- und LSU-Regionen identifiziert werden. Insgesamt wurden 40 Sequenzierungen durchgeführt, wobei die Fragmentlänge der PCR-Produkte zwischen 168 bp - 892 bp variierte. Wie bei den Wurzelproben aus Gülzow war die Identifikation überwiegend über die LSU-Sequenzen möglich. Die Pilzpartner konnten bis auf Gattungs- bzw. Artebene bestimmt werden. In Tabelle 3.9 sind die Beschreibung der EM-Morphotypen sowie ihre identifizierten EM-Pilzpartner aufgelistet.

**Tabelle 3.9:** Beschreibung der EM-Morphotypen und ihrer identifizierten EM-Pilzpartner an den Feinwurzeln von *S. viminalis* Klonen der KUP Uppsala, Schweden.

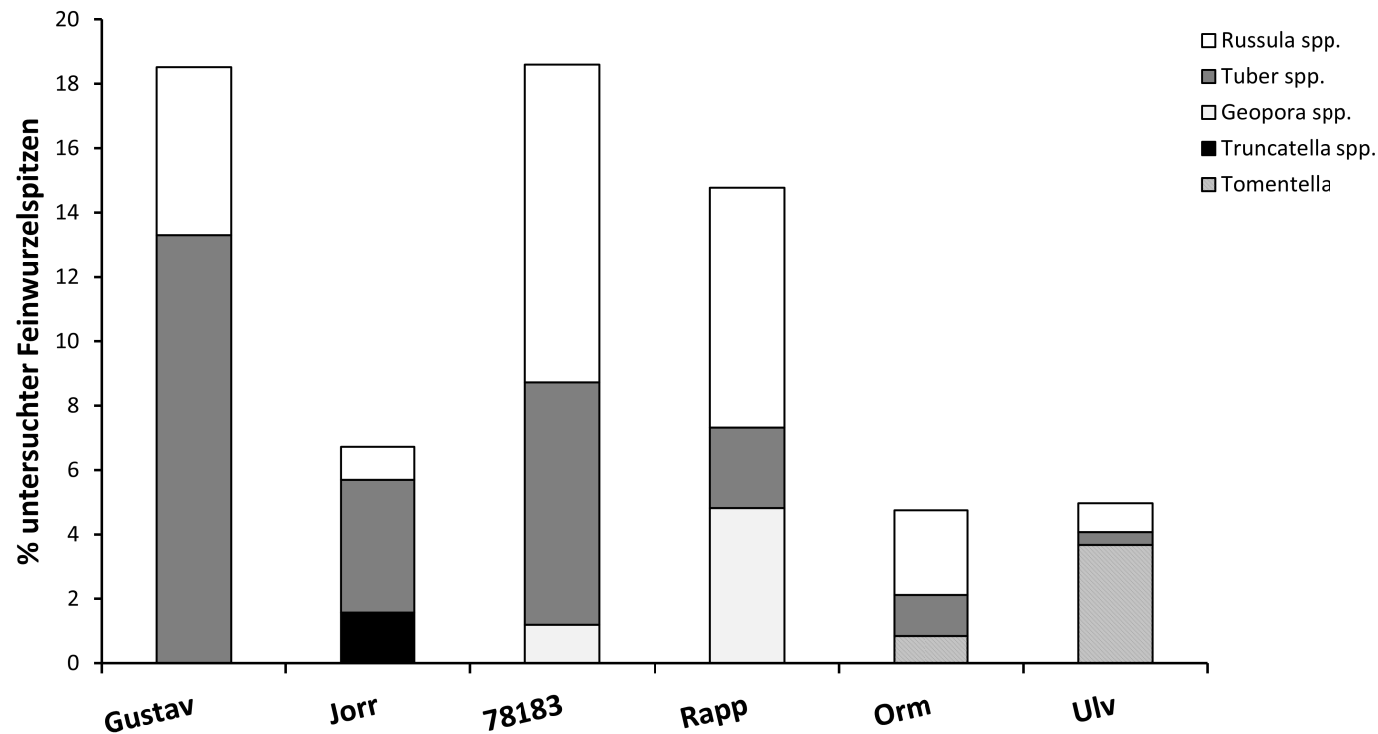
Morphotyp	Beschreibung	Identifizierte EM-Pilze
1	unverzweigt unverzweigte Enden: ocker, gelblich-braun, Spitzen auch am Grunde wenige abziehende, verzweigte Hyphen äußere Mantelschicht: pseudoparenchymatisch	<i>Tuber rapaeodorum</i>
2	unverzweigt unverzweigte Enden: dunkelbraun, braun Spitzen auch abziehende, verzweigte Hyphen äußere Mantelschicht: pseudoparenchymatisch	<i>Tomentella botryoides</i> <i>Geopora</i> spp.
3	unverzweigt unverzweigte Enden: braun, Spitzen auch abziehende, verzweigte Hyphen äußere Mantelschicht: pseudoparenchymatisch	<i>Tuber</i> spp. <i>Russula</i> spp.
4	unverzweigt unverzweigte Enden: dunkelbraun, Spitzen auch abziehende, verzweigte Hyphen äußere Mantelschicht: pseudoparenchymatisch	<i>Truncatella</i> spp. <i>Russula</i> spp.
5	unverzweigt unverzweigte Enden: gelblich, Spitzen auch abziehende, verzweigte Hyphen äußere Mantelschicht: pseudoparenchymatisch	<i>Russula laccata</i>

Drei Morphotypen beinhalteten die Gattung *Russula* bzw. die Art *Russula laccata*. Zwei Morphotypen enthielten u. a. die Gattung *Tuber* bzw. die Art *Tuber rapaeodorum*. Insgesamt wurden acht EM-Pilze identifiziert. Die Anzahl der EM-Pilzpartner an den *S. viminalis* Klonen variierte zwischen vier (Gustav, Rapp) und sechs (Orm) EM-Pilz Taxa. Die EM-Raten (total und Pilzpartner-spezifisch) sind in Tab. 3.10 aufgelistet.

**Tabelle 3.10:** Gesamte EM-Raten (% der untersuchten Feinwurzelspitzen) und EM-Raten einzelner Pilzpartner (% der untersuchten Feinwurzelspitzen) von *S. viminalis* Klonen der KUP Uppsala, Schweden.  $n = 4$ , unterschiedliche Buchstaben bezeichnen signifikante Unterschiede ( $P < 0,05$ ).

EM-Pilze	Gustav	Jorr	78183	Rapp	Orm	Ulv
EM [%]	18,5 <sup>a</sup>	6,7 <sup>a</sup>	18,6 <sup>a</sup>	14,8 <sup>a</sup>	4,8 <sup>a</sup>	5,0 <sup>a</sup>
<i>Tuber rapaeodorum</i> [%]	6,0 <sup>a</sup>	<1,0 <sup>a</sup>	4,5 <sup>a</sup>	-	<1,0 <sup>a</sup>	<1,0 <sup>a</sup>
<i>Tomentella botryoides</i> [%]	-	-	-	-	<1,0 <sup>ab</sup>	3,7 <sup>b</sup>
<i>Tuber</i> spp. [%]	7,3 <sup>b</sup>	3,7 <sup>ab</sup>	3,0 <sup>ab</sup>	2,5 <sup>ab</sup>	<1,0 <sup>a</sup>	<1,0 <sup>a</sup>
<i>Truncatella</i> spp. [%]	-	1,6 <sup>a</sup>	-	-	-	-
<i>Russula</i> spp. [%]	-	<1,0 <sup>a</sup>	1,9 <sup>a</sup>	-	<1,0 <sup>a</sup>	-
<i>Russula laccata</i> [%]	5,0 <sup>ab</sup>	<1,0 <sup>a</sup>	8,0 <sup>b</sup>	2,5 <sup>ab</sup>	1,4 <sup>ab</sup>	<1,0 <sup>a</sup>
<i>Geopora</i> spp. [%]	-	-	1,2 <sup>a</sup>	4,8 <sup>a</sup>	-	-
<i>Russula</i> spp. [%]	<1,0 <sup>a</sup>	-	-	4,9 <sup>b</sup>	<1,0 <sup>ab</sup>	<1,0 <sup>a</sup>
<i>Tuber</i> spp. total [%]	13,3 <sup>b</sup>	4,1 <sup>a</sup>	7,5 <sup>ab</sup>	2,5 <sup>a</sup>	1,3 <sup>a</sup>	<1,0 <sup>a</sup>
<i>Russula</i> spp. total [%]	5,2 <sup>ab</sup>	1,0 <sup>a</sup>	9,9 <sup>b</sup>	7,5 <sup>ab</sup>	2,6 <sup>ab</sup>	<1,0 <sup>a</sup>

Als dominante EM-Pilzpartner von *S. viminalis* traten *Russula* spp. und *Tuber* spp. auf. Bei den Klonen Jorr, Orm und Ulv wurden einige EM-Pilzpartner mit nur geringer Häufigkeit von <1% der untersuchten Feinwurzelspitzen gefunden; bei Jorr waren es drei von fünf Pilzpartnern, bei Orm fünf von sechs und bei Ulv war die EM-Rate bei vier von fünf EM-Pilzpartnern <1% der untersuchten Feinwurzelspitzen. *Tuber* spp. und *Russula laccata* konnten als EM-Pilzpartner bei allen Klonen gefunden werden, während *Truncatella* spp. nur bei Jorr (1,6% der untersuchten Feinwurzelspitzen) detektiert wurde. *Tomentella botryoides* wurde an den Wurzeln der Klone Orm (<1% der untersuchten Feinwurzelspitzen) und Ulv (3,7% der untersuchten Feinwurzelspitzen) identifiziert und *Geopora* spp. konnte bei 78183 (1,2% der untersuchten Feinwurzelspitzen) und Rapp (4,8% der untersuchten Feinwurzelspitzen) detektiert werden (Tab. 3.10, Abb. 3.5).



**Abbildung 3.5:** Relative Häufigkeit der identifizierten EM-Morphotypen (% der untersuchten Feinwurzelspitzen) bei *S. viminalis* Klonen der KUP Uppsala, Schweden. Die EM-Pilze wurden hier auf Gattungsebene dargestellt. *Tuber rapaeodorum* und *Tuber* spp. wurden zu *Tuber* spp. zusammengefasst; *Russula laccata*, *Russula* spp. und *Russula* spp. wurden zu *Russula* spp.. *Tomentella botryoides* wurde hier als *Tomentella* bezeichnet.

### 3.2.3 Test auf Interaktion zwischen Rostpilzanfälligkeit und Blattchemie bzw. EM-Rate

Der Test auf Interaktion zwischen Rostpilzanfälligkeit und Blattchemie sowie Rostpilzanfälligkeit und EM-Raten der Feinwurzeln wurde für die KUP Gülzow sowohl mit dem Faktor Rostpilzanfälligkeit (R) als auch mit den Boniturdaten aus dem Jahr 2011 der LFA Gülzow durchgeführt. In der KUP Uppsala konnte der witterungsbedingte Rostpilzbefall zum Probenahmezeitpunkt der Blatt- und Wurzelproben nicht zur Unterscheidung der klonspezifischen Rostanfälligkeit verwendet werden; daher erfolgte die Differenzierung auf der Basis relevanter Literaturquellen (vgl. Kapitel 2.3.1).

Die Rostpilzbonitur der Weiden- und Pappelklone (KUP Gülzow) wurde von der LFA Gülzow nach den Richtlinien des Bundessortenamts durchgeführt. Die Ergebnisse sind im Anhang A2 zu finden. Hierbei fiel auf, dass die Boniturdaten der Klone Weide 8 und 78101 von der Einteilung in resistente und anfällige Klone, die auf Grund von Referenzliteratur (vgl. Kapitel 2.3.1) gemacht wurde, abwichen.

Basierend auf einer einfaktoriellen ANOVA ( $P < 0,05$ ) zeigte sich keine klare Trennung zwischen Rostpilz-anfälligen und -resistenten Klonen. Innerhalb der Pappelklone unterschieden sich die Rostpilz-anfälligen Klone Raspalje und Beaupré signifikant von den Rostpilz-resistenten Klonen Max 2 und 3. Raspalje und Weide 6 (Rostpilz-resistent) traten jeweils signifikant hervor.

Die getestete Interaktion zwischen chemischen Eigenschaften der Blätter und Rostpilzanfälligkeit bei den Klonen der KUP Gülzow ergaben keinen signifikanten Zusammenhang beim Test der Boniturdaten (Daten werden hier nicht gezeigt). Die Analyse mittels zweifaktorieller ANOVA wird in Tabelle 3.11 gezeigt. Die SA-Konzentration der Blätter unterschied sich zwischen den Klonen signifikant nach folgenden geprüften Einflussfaktoren: Rostpilzanfälligkeit, Baumart und ihre Interaktion. Ein weiterer signifikanter Effekt der Baumart bestand in Bezug auf die CT-Konzentration der Blätter. Die  $\text{Chl}_a$ -Konzentration der Blätter wies keine signifikanten Unterschiede zwischen den getesteten Versuchsvarianten auf.

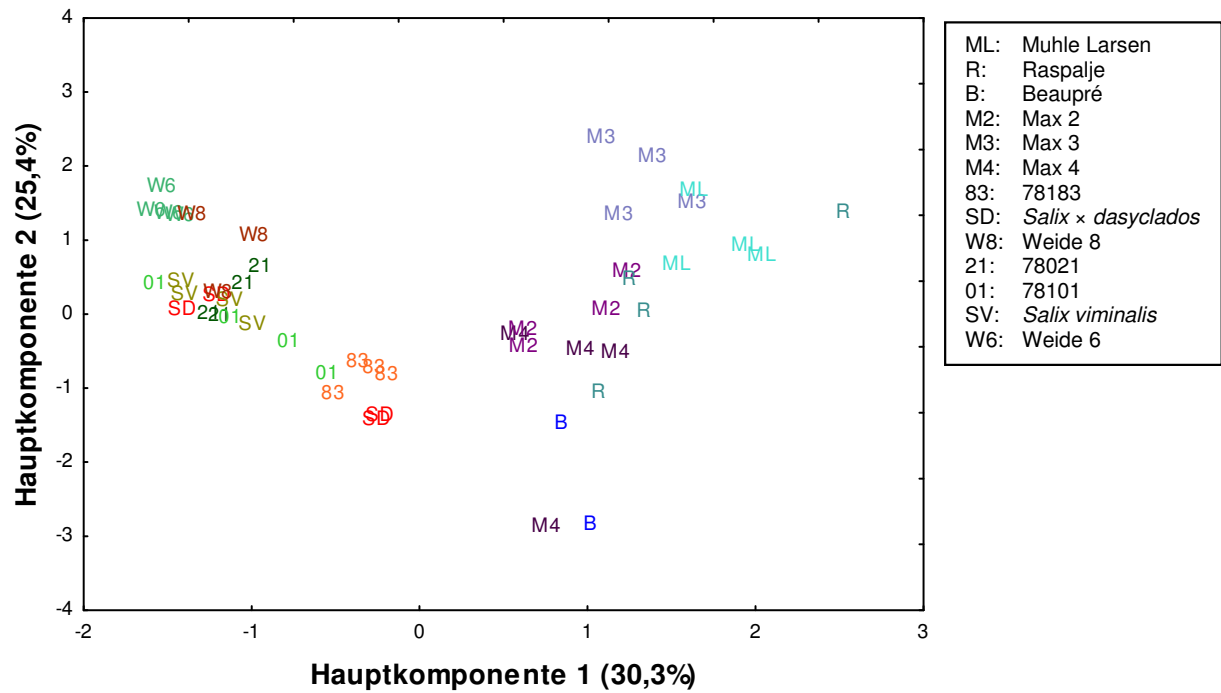
Ein Zusammenhang von Rostpilzanfälligkeit und getesteten chemischen Blatteigenschaften der *S. viminalis* Klone aus der KUP Uppsala konnte nicht nachgewiesen werden (Daten werden hier nicht gezeigt).

**Tabelle 3.11:** Effekte der Rostpilzanfälligkeit (R), der Baumart (B) und ihrer Interaktion (R x B) auf die Konzentrationen der Salizylsäure, kondensierten Tannine und Chlorophyll total in den Blättern von Pappel- und Weidenklonen der KUP Gülzow; zweifaktorielle ANOVA ( $P < 0,05$ ); DF: Freiheitsgrad.

Quelle	DF	F	P
<b>Salizylsäure</b>			
R	1	18,430	<0,001
B	1	49,516	0,000
R x B	1	18,551	<0,001
Error	48		
<b>Kondensierte Tannine</b>			
R	1	0,105	0,747
B	1	25,185	<0,001
R x B	1	1,429	0,238
Error	48		
<b>Chlorophyll total</b>			
R	1	2,006	0,163
B	1	0,637	0,429
R x B	1	0,688	0,411
Error	48		

Der Einfluss der Rostpilzanfälligkeit auf die EM-Raten der KUP Gülzow wurde durch zwei statistische Methoden getestet: PCA (Boniturdaten, Pilzpartner-spezifische EM-Raten) und zweifaktorielle ANOVA (Faktoren Rostpilzanfälligkeit, Baumart) (Abb. 3.6, Tab. 3.12). Beide Tests zeigten übereinstimmend, dass die Baumart einen signifikanten Einfluss auf die EM-Raten besitzt. Ein signifikanter Einfluss der Rostpilzanfälligkeit auf die EM-Raten konnte nicht nachgewiesen werden. Die Tabelle 3.12 weist eine Ausnahme auf: die EM-Rate des Pilzpartners *S. bovista* wurde signifikant von der Baumart, der Rostpilzanfälligkeit sowie ihrer Interaktion beeinflusst. Zwischen den EM-Raten der KUP Uppsala und der Rostpilzanfälligkeit der Klone bestand kein signifikanter Zusammenhang.

## Ergebnisse



**Abbildung 3.6:** Score Plot der Hauptkomponenten 1 vs. 2 einer PCA basierend auf den Pilzpartner-spezifischen EM-Raten der Pappel- und Weidenklone aus der KUP Gülzow sowie ihres Rostpilzbefalls (Boniturdaten Gülzow). Die EM-Pilze wurden hier auf Gattungsebene dargestellt. *Scleroderma fuscum* und *Scleroderma bovista* wurden zur Gattung *Scleroderma* zusammengefasst.

**Tabelle 3.12:** Effekte der Rostpilzanfälligkeit (R), der Baumart (B) und ihrer Interaktion (R x B) auf die gesamte EM-Besiedlung (EM total) und EM-Diversität der Pappel- und Weidenklone aus der KUP Gülzow; zweifaktorielle ANOVA ( $P < 0,05$ ); DF: Freiheitsgrad.

Quelle	DF	F	P
<b>EM total</b>			
B	1	771,456	<0,001
R	1	0,061	0,805
R x B	1	3,865	0,055
Error	48		
<b><i>Inocybe</i> spp.</b>			
B	1	28,553	<0,001
R	1	0,326	0,571
R x B	1	0,017	0,897
Error	48		
<b><i>S. bovista</i></b>			
B	1	18,658	<0,001
R	1	5,970	<0,001
R x B	1	6,917	<0,001
Error	48		
<b><i>S. fuscum</i></b>			
B	1	15,954	<0,001
R	1	0,273	0,604
R x B	1	0,675	0,415
Error	48		
<b><i>Tomentella</i> spp./</b>			
<b><i>Russula</i> spp.</b>			
B	1	6,877	<0,001
R	1	0,063	0,803
R x B	1	3,855	0,055
Error	48		
<b><i>Russula</i> spp.</b>			
B	1	30,563	<0,001
R	1	0,045	0,833
R x B	1	0,004	0,950
Error	48		



## 4. Diskussion

### 4.1 Einzelne und interaktive Wirkung eines EM-Pilzes und eines Rostpilzisolates auf die Blattchemie eines Pappelklons im Modellversuch

Interaktionen von EM-Pilzen und Rostpilzen (*Melampsora* spp.) bei gleichzeitiger Nutzung einer Wirtspflanze wurden bisher nicht untersucht, obwohl eine Konkurrenz um Assimilate der gemeinsamen Wirtspflanze vorausgesetzt werden kann. Die hierdurch verringerte Assimilatversorgung des EM-Pilzes kann den Nutzen der Symbiose für ihn und somit auch für die Wirtspflanze verringern. Daher wurde diese Arbeitshypothese im Gefäßversuch an einer Modellkombination mit den definierten Partnern EM-Pilz (*Hebeloma mesophaeum* (Pers.) Quélet Stamm MÜN), Rostpilz (*Melampsora larici-populina*, *Mlp*, Isolat 98AG31, Moÿ-de-l'Aisne, Frankreich) und einem Pappelklon (*Populus trichocarpa* × *deltoides* `Beaupré`) als Wirtspflanze unter kontrollierten Umweltbedingungen geprüft. Hierbei wurde untersucht wie sich durch Rostpilzinfektion veränderte Symbioseverhältnisse zwischen einer Wirtspflanze und einem EM-Pilz auf den Primär- als auch auf den Sekundärmetabolismus der Wirtspflanze auswirken. Eine Rückwirkung auf den Sekundärmetabolismus wird hierbei als Indikator veränderter Anfälligkeit gegenüber Krankheiten im Allgemeinen und einer Rostpilzinfektion im Speziellen angesehen.

#### 4.1.1 Effekte der Rostpilzinfektion auf den Primärmetabolismus

Ektomykorrhizierung führte ohne Rostpilzinfektion der Wirtspflanze zur erhöhten Konzentration an Kohlenhydraten (Hexosen, Pentosen) in den Blättern (vgl. Tab. 3.3). Diese Erhöhung deutet auf eine verbesserte Nährstoffversorgung der Wirtspflanze in der Symbiose hin, welche ihren Primärmetabolismus steigern kann. Dieses wurde auch in anderen Untersuchungen wie z. B. bei Nehls et al. (2010) belegt. Mykorrhizierung kann zu einer Steigerung der Assimilatproduktion durch die Wirtspflanze beitragen, da der Pilzpartner die Nährstoff- (insbesondere N und P) und Wasser-Versorgung verbessern kann und gleichzeitig einen erhöhten Assimilatverbrauch der Pflanze durch einen steigenden Bedarf bewirkt. Nach Agerer (2001) variiert dieser Bedarf pilzartenspezifisch. Der im vorliegenden Gefäßversuch verwendete Stamm von *H. mesophaeum* führte übereinstimmend mit der erwarteten Wirkung in der Symbiose zu einer gesteigerten Assimilatproduktion – respektive zu einer erhöhten Kohlenhydratkonzentration. Die Ergebnisse der Mykorrhizierungsraten der Varianten EM und EM+R passen zu den gemessenen Konzentrationen an Kohlenhydraten. Eine höhere EM-Besiedlung trat in Zusammenhang mit einer höheren Konzentration an Kohlenhydraten auf, was auf eine wechselseitige Wirkung hindeutet. Bei der kombinierten Variante EM+R lagen

die Kohlenhydrate nicht in erhöhter Konzentration vor. Es wird davon ausgegangen, dass die gleichzeitige Besiedlung der Wirtspflanze an Blättern (Rostpilzinfektion) und Wurzeln (Ektomykorrhizierung) - wie in der Arbeitshypothese dargelegt - zur Konkurrenz zwischen den beteiligten Pilzpartnern führte (vgl. Tab. 3.3).

SA dient als Signalmolekül in der Aktivierung bestimmter Antworten bei der Pflanzenabwehr. Über diese zentrale Rolle bei der lokalen Abwehrreaktion an der Infektionsstelle sowie bei der Induktion der systemischen Resistenz berichteten z. B. Durner et al. (1997). Sowohl Rostpilzinfektion alleine und in Kombination mit Mykorrhizierung der Wirtspflanze führte zu signifikant erhöhten SA Konzentration in den Blättern (Tab. 3.1). Übereinstimmend hiermit, konnte auch die Aktivierung der Gene des SA-abhängigen Wegs durch Rostpilzinfektion mit *M. larici-populina* und *M. medusae* f. sp. *deltoidae* bei Hybridpappelklonen von Azaiez et al. (2009) nachgewiesen werden. Die lokale Abwehr geht meistens mit einer hypersensitiven Reaktion (HR) einher, die durch die Entwicklung von Läsionen erkennbar wird und das Wachstum bzw. die Ausbreitung des Pathogens eindämmt. Einen Nachweis über die Hochregulation von HR Genen bei Hybridpappeln, die mit einem kompatiblen *Melampsora* spp. Stamm infiziert wurden, erbrachten Azaiez et al. (2009). Zusammen mit einer HR erfolgt die Induktion verschiedener Abwehr-assoziiierter Gene, deren Produkte direkt oder indirekt auf die Abwehr des Pathogens Einfluss nehmen. Direkt führen sie zur Bildung antimikrobieller Enzyme und Sekundärmetabolite wie den Phenylpropanoiden und Phytoalexinen und indirekt helfen sie die Wirtszellwand durch Produkte wie Lignin oder Suberin zu verstärken.

Die Pflanzenabwehr mittels SA wird auch während der Ausbildung von arbuskulärer Mykorrhizierung oder Ektomykorrhizierung an beispielsweise Weiden aktiviert (Zhao & Qi 2008; Baum et al. 2009). In unserem Gefäßversuch war zum Zeitpunkt der Probenahme die EM bereits etabliert, so dass die SA Konzentration nicht signifikant erhöht war. In der Kombination mit Rostpilz wurde allerdings der höchste Wert gemessen (vgl. Tab. 3.1). Dieses deutet darauf hin, dass durch die positive Förderung der EM Besiedlung eine effektivere Synthese von schnellen Abwehrsubstanzen wie SA stattfinden kann.

Eine weitere Stärkung der Pappel durch den EM-Pilz zeigte sich in der signifikant erhöhten Konzentration von Suberin. In den Rostpilzvarianten war die Konzentration hingegen nur leicht erhöht. Suberin wird im Allgemeinen als Ergebnis einer Abwehrreaktion in die Zellwand der Pflanze eingelagert und funktioniert dort als physikalische Barriere bei der Wundheilung sowie beim Schutz gegen Feuchtigkeitsverlust und Anfälligkeit gegen Pathogene (Jabaji-Hare 1999; Facchini et al. 2002).

Während bei der Rostpilzinfektion die Suberin Konzentration in den Blättern leicht anstieg, sank die Konzentration von Cyclooctacosan, welches aus Fettsäuren synthetisiert wird, signifikant ab. Cyclooctacosan, ein Alkan in den Blättern der Wirtspflanze, wurde erstmalig in

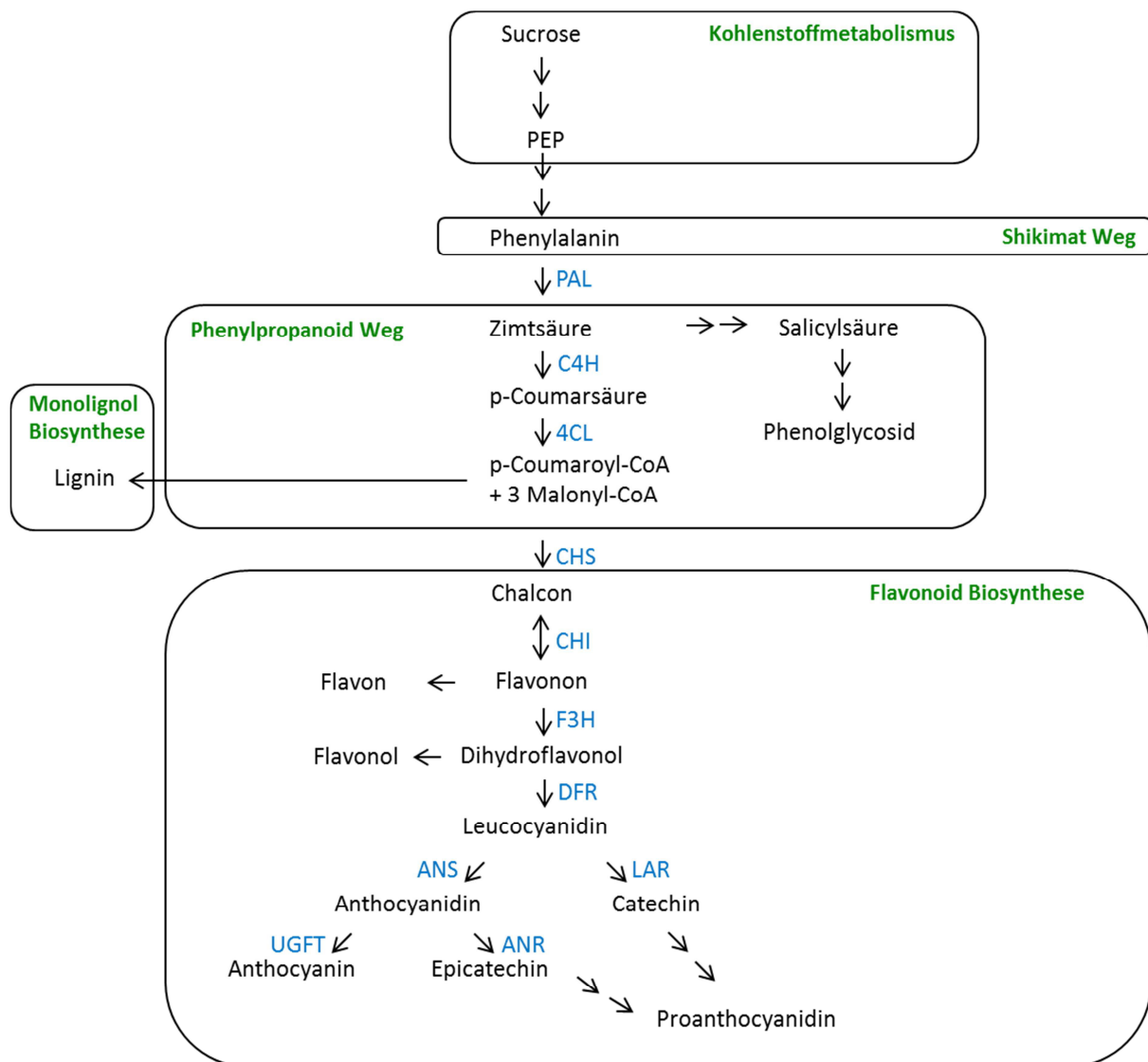
der vorliegenden Arbeit nachgewiesen. Fettsäuren spielen im Allgemeinen eine wichtige Rolle bei der Pathogenabwehr der Pflanzen. Der Schutz vor Pathogenen – speziell durch Alkane – wurde in der Cuticula von Pappel- und Weidenblättern nachgewiesen (Cameron et al. 2002). Während der Rostpilzinfektion scheint die Cuticula-Struktur degeneriert zu werden, da Zellwand-degradierende Enzyme durch den Pilz freigesetzt werden (Tian et al. 2009). Dieses Phänomen könnte auch die Abnahme der Cyclooctacosan-Konzentration in der Rostpilzvariante erklären. Da zwischen der kombinierten pilzlichen Variante (EM+R) und der mykorrhizierten (EM) sowie nicht-mykorrhizierten Variante (Kontrolle) kein signifikanter Unterschied bestand, scheint die EM-Besiedlung die Auswirkungen des Blattpathogens auf die Zellwand zu kompensieren.

#### **4.1.2 Effekte der Rostpilzinfektion auf den Sekundärmetabolismus**

Die Änderungen der primären Prozesse des Kohlenstoffmetabolismus beeinflussten auch die Prozesse im Sekundärmetabolismus speziell in Bezug auf die Bildung phenolischer Substanzen und Sterole. Die Rostpilzinfektion verursachte bei dem untersuchten Pappelklon eine signifikante Abnahme der Konzentration an Phenolen (total), während sie in Verbindung mit Ektomykorrhizierung (EM+R) zu einer signifikanten Erhöhung der Konzentration an Phenolen in den Blättern über den Wert aller anderen getesteten Varianten führte. Phenole gelten im Allgemeinen als Abwehrsubstanzen gegen Pathogene und beinhalten eine große Auswahl verschiedener Stoffe wie CT und andere Flavonoide. Durch blattchemische Analysen mittels Py-FIMS konnten drei Untergruppen der chemisch diversen Gruppe der Flavonoide detektiert werden, die in der Rostpilzvariante in signifikant geringeren Konzentrationen vorlagen: Flavone, Flavanone und Flavanole. Im Gegensatz dazu war die CT Konzentration im Blatt nach Rostpilzinfektion signifikant erhöht. Diese Ergebnisse können nach Miranda et al. (2007) über die Transkriptomanalyse Rostpilz-infizierter (*M. medusae*) Hybridpappel Blätter (*Populus trichocarpa* × *deltoides*) erklärt werden. Zwischen dem sechsten und neunten Tag nach Inokulation findet die größte Änderung der Genexpression im Flavonoidweg statt, da sich die Pflanze kontinuierlich versucht gegen die Infektion zu wehren. Während dieser Zeit bildet der Rostpilz Uredosporenlager im Blatt aus, die ab dem neunten Tag nach Inokulation an der Blattoberfläche hervorbrechen. Am sechsten Tag nach Inokulation werden im Blatt vorwiegend Abwehrsubstanzen der Gruppen Flavone, Flavanone und Flavanole synthetisiert. Sie stehen am Anfang des Flavonoidwegs (vgl. Abb. 4.1) und werden zum neunten Tag hin entweder abgebaut oder weitersynthetisiert. Am Ende dieses Wegs stehen die kondensierten Tannine, die nach der Studie von Miranda et al. (2007) am neunten Tag akkumuliert vorliegen. Da sich die vorliegenden Analysen auf den zehnten Tag

nach Inokulation mit Rostpilzen beziehen, entspricht die gemessene Anreicherung an CT dem erwarteten Verlauf.

Auch in den mykorrhizierten Varianten (EM, EM+R) wurde eine verstärkte Synthese der CT sowie der Flavonoidgruppen Flavone, Flavanone und Flavanole gemessen. Da keine vergleichbaren Studien über die Interaktion von Ektomykorrhizierung ohne und mit Blattpathogenen auf einer Wirtspflanze durchgeführt wurden, kann keine Verallgemeinerung dieser Wirkung vorgenommen werden. Es wird folgender Zusammenhang als mögliche Ursache der Entwicklung angenommen: durch die EM Besiedlung wurde die Nährstoffversorgung der Pappelklone verbessert, was eine Erhöhung der Kohlenhydratproduktion sowie der -konzentration im Blatt ermöglichte. Hierdurch wurde die Grundlage für eine erhöhte Bildung von Sekundärmetaboliten wie CT und anderen Flavonoiden gebildet. Eine wechselseitige Beziehung von Wurzel- und Blattkonzentrationen der Phenole (total) und CT wurde von Kraus et al. (2004) an fünf Baumarten bewiesen.



**Abbildung 4.1:** Schematische Auszüge der Verknüpfung von Primär- und Sekundärmetabolismus in Pappelblättern modifiziert nach Mellway et al. (2009). Blau dargestellt sind die beteiligten Enzyme; PAL: Phenylalanin Ammonium Lyase; C4H: Cinnamat-4-Hydroxylase; 4CL: 4-coumarat-CoA Ligase; CHS: Chalconsynthase; LAR: Leucoanthocyanidinreductase; CHI: Chalcon-Flavanon Isomerase; F3'H: Flavanon 3-Hydroxylase; DFR: Dihydroflavonol Reductase; ANS: Anthocyanidin Synthase; ANR: Anthocyanidin Reductase; UGFT: UDP-Glc Flavonoid Glucosyltransferase.

Neben den phenolischen Verbindungen war auch die Konzentration an Sterol, einem Brassinosteroid, in den Blättern der ektomykorrhizierten Varianten signifikant gegenüber den nicht-mykorrhizierten Varianten erhöht. Dieser Effekt der EM wurde in der vorliegenden Untersuchung erstmalig festgestellt. Sterol besitzt in Pflanzen eine Phytohormon-ähnliche Funktion mit regulatorischen Aktivitäten z. B. auf die Ausdehnung und Zellteilung oder Stimulation der Ethylen-Biosynthese. Des Weiteren kann es mit den Phytohormonen Auxin und Abscisinsäure interagieren (Gross & Parthier 1994). Sterole sind Bestandteile von epicuticulären Wachsen von Pappeln und Weiden (Cameron et al. 2002). In der Membran erniedrigen Sterole die Fluidität der Membran.

Die Synthese der phenolischen Abwehrsubstanzen wie die der CT ist für die Pflanze Energie- und Kohlenstoff-intensiv (Major et al. 2010). Zur Produktion von SA wird jedoch weniger Kohlenstoff benötigt (Bryant et al. 1983), so dass SA bei Rostpilzbefall scheinbar als bevorzugte Abwehrsubstanz gebildet wird. Ihre Bildung findet sehr früh während der Phenylpropanoidsynthese statt, wohingegen die Synthese der CT als letzter Schritt der Flavonoidsynthese abläuft. Die EM-Besiedlung mit ihrer erhöhten Nährstoffzufuhr unterstützt die Wirtspflanze, was insgesamt eine gestärkte Abwehr gegen die Infektion des Pathogens (Rostpilz) bewirkt.

#### **4.2 Prüfung der Interaktion von Mykorrhizierung und Rostpilzanfälligkeit in der blattchemischen Qualität von *Salix*- und *Populus*-Klonen in Feldversuchen**

In je einem Feldversuch in KUPs an den Standorten Gülzow (Deutschland) und Uppsala (Schweden) wurde der Zusammenhang zwischen Ektomykorrhizierung und Rostpilzinfektion an *Salix* spp. und *Populus* spp. untersucht. Zu einem Zusammenhang dieser beiden Parameter an *Salix*- und *Populus*-Klonen liegen bisher noch keine Publikationen anderer Autoren vor. An Hand der Feldversuche wurden intraspezifische und interspezifische Unterschiede zwischen den Klonen in den EM-Raten und der EM-Diversität sowie in der chemischen Zusammensetzung der Blätter untersucht. Die Bonitur des Rostpilzbefalls in der KUP Uppsala konnte zum Probenahmezeitpunkt aufgrund der vorherigen Witterung (niederschlagsfrei und sonnig) nicht durchgeführt werden. Bedingt durch die fehlende Infektion war eine Differenzierung der Klone nicht möglich, so dass die Einstufung in Rostpilz-resistente und -anfällige Klone auf Grund entsprechender Referenzliteratur (vgl. Tab. 2.5) vorgenommen wurde. Im Fall der KUP Gülzow wurden die Boniturdaten 2011 von der LFA Gülzow zur Verfügung gestellt. Hierbei wichen die Boniturdaten der Weidenklone Nr. 8 und 78101 von Referenzangaben bezüglich der Anfälligkeit/Resistenz gegenüber Rostpilzinfektionen ab. Die Anfälligkeit gegen Pathogene wie dem Rostpilz ist im Allgemeinen standortabhängig. Hinzu kommt, dass Pathogene mit veränderten Virulenzen Wirtsresistenzen überwinden können. Daher wird beispielsweise der Weidenklon 78183 im Jahre 2003 von Mc Cracken & Dawson (2003) als vergleichsweise resistent bezeichnet, während er 2008 (Rönnberg-Wästljung et al. 2008) bereits als anfällig eingestuft wird.

#### 4.2.1 Klonspezifische EM-Diversität und Rostpilzanfälligkeit

Gattungsspezifisch wiesen alle untersuchten Pappelklone der KUP Gülzow höhere EM-Raten auf als die der untersuchten Weidenklone auf dieser Fläche. Auch an den *S. viminalis* Weidenklonen der KUP Uppsala wurde eine sehr geringe Mykorrhizierungsrate festgestellt. Dieses Ergebnis entspricht den in der Literatur angegebenen Verhältnissen der Mykorrhizierung dieser beiden Gattungen sowohl im Forstbestand als auch im Kurzumtrieb auf Ackerflächen (vgl. z. B. Baum et al. 2009). Dieser gattungsspezifische Unterschied der EM-Rate ist zum einen auf die dichte Verzweigung des Wurzelwerks von Weiden zurückzuführen. Zusätzlich waren die schwedischen Wurzelproben auf Grund des regenarmen Sommers im Jahr der Probenahme sehr trocken, was zu einem hohen Anteil nekrotropher Feinwurzeln und einem stark reduzierten Anteil vital ektomykorrhizierter Feinwurzeln führte. Beispielsweise war die EM-Rate des Weidenklons 78183 auf der KUP in Uppsala (18,6% untersuchter Feinwurzelspitzen) um die Hälfte geringer als die in der KUP Gülzow (36,7% untersuchter Feinwurzelspitzen) (Tab. 3.8, 3.10). Dieses Ergebnis bestätigt neben dem Genotyp der Wirtspflanze den signifikanten Einfluss des Standortes auf die EM-Rate der Klone und entspricht den Ergebnissen anderer Autoren auf KUPs mit großer geographischer Distanz (Baum et al. 2002).

Zur Ermittlung der EM-Diversität in den KUPs Gülzow und Uppsala wurde die morphologisch-anatomische Charakterisierung mit molekularbiologischen Methoden kombiniert. Die morphologisch-anatomische Charakterisierung der EM-Morphotypen erfolgte nach makroskopischen und mikroskopischen Kriterien (vgl. Agerer 1987-1998; Haug 2002). Die Kombination dieser Methode mit molekularbiologischen Analysen ist eine anerkannte Vorgehensweise um Ektomykorrhizierung zu beschreiben und ihre Vergesellschaftung (Wirtspflanze mit EM-Pilzstämmen) zu analysieren (Horton & Bruns 2001) und hat sich auch bei den hier vorliegenden Untersuchungen bewährt. Hierbei kam es wie in anderen Untersuchungen teilweise zu einer Neuklassifizierung einiger Morphotypen entsprechend ihrer sequenzierten ITS- und LSU-Regionen. Diese beiden Regionen sind zur Identifikation der EM-Pilze gut geeignet, da die ITS als nicht-kodierende Region eine geringe Variabilität besitzt. Die LSU zeichnet sich als kodierende, hoch konservierte Region aus. Hinzu kommt, dass beide Regionen ubiquitär in Organismen verbreitet sind.

Auf Grund der kombinierten Methoden konnten in der KUP Gülzow sechs EM-Pilzpartner der untersuchten Klone und in der KUP Uppsala acht EM-Pilzpartner der untersuchten Klone identifiziert werden (Tab. 3.8, 3.10). In Agerers „colour atlas of ectomycorrhiza“ (1987–1998), welches die größte verfügbare systematische Sammlung über die Beschreibung der EM-Morphotypen darstellt, werden für schnellwachsende Laubbäume wie *Eucalyptus*, *Populus* oder *Salix* nur drei bis vier EM-Morphotypen beschrieben. In der aktuellen Software DEEMY

(Characterization and determination of ectomycorrhizae, 2004 - 2014) der LMU München wurde diese Anzahl bedeutend erhöht und kontinuierlich erweitert. Dennoch kann es vorkommen, dass ein Morphotyp nicht eindeutig identifiziert werden kann, da seine Beschreibung bisher nicht publiziert oder der Morphotyp von mehreren Pilzpartnern gebildet wurde - wie es in der vorliegenden Arbeit in der KUP Gülzow vorkam (Kombination aus *Tomentella* spp. und *Russula* spp.). Die anderen Morphotypen der KUP Gülzow konnten als *Inocybe* spp., *Scleroderma bovista*, *Scleroderma fuscum* und *Russula* spp. identifiziert werden, welche alle zu den Basidiomyceten zählen. Zusätzlich wurde ein Ascomycet der Ordnung Pezizales ausschließlich am Klon *S. × dasyclados* gefunden (Tab. 3.8). In der KUP Uppsala konnten alle Morphotypen eindeutig bis zur Gattungs- oder Artebene identifiziert werden: drei Ascomyceten *Tuber rapaeodorum*, *Tuber* spp. und *Geopora* spp sowie die Basidiomyceten *Tomentella botryoides*, *Truncatella* spp., *Russula laccata* und *Russula* spp.. Als Vertreter der Gattung *Russula* wurden zwei unterschiedliche Morpho- und Genotypen identifiziert (Tab. 3.10).

Einige EM-Pilztaxa dominierten Pflanzengenotyp-spezifisch, während andere an allen untersuchten Klonen der Standorte verbreitet waren. Auf der KUP Gülzow traten *Inocybe* spp. sowohl an Pappel- als auch an Weidenklonen als häufige EM-Partner auf. An Weiden dominierte zusätzlich der kombinierte Morphotyp *Tomentella* spp./*Russula* spp. (vgl. Abb. 3.4). Auf der KUP Uppsala traten die meisten Pilzpartner mit nur geringer Besiedlungsdichte von <1% der untersuchten Feinwurzeln auf. Die meisten EM-Pilzpartner zählten zu den Gattungen *Russula* und *Tuber* (vgl. Abb. 3.5). *Russula* Pers. ist eine der artenreichsten Hutpilzgattungen mit einem Verbreitungsschwerpunkt in der nördlichen Hemisphäre. Daher erscheint ein dominantes Vorkommen nicht ungewöhnlich. Allerdings fehlten *Russula* spp. auf anderen KUPs in Mittelschweden (Hryniewicz et al. 2012). Ursache hierfür könnten standortspezifische, unterschiedlich dominante Eintragswege von EM-Pilzsporen sein, da es sich bei KUPs auf Ackerflächen um Standorte mit einem auf Grund der vormals fehlenden Wirtspflanzen geringen indigenen Inokulationspotenzial handelt. Hryniewicz et al. (2012) vermuteten, dass die Dominanz von Agaricales, zu denen auch *Inocybe* spp. und *Russula* spp. zählen, in KUPs auf ihre effektive Luftverbreitung der Sporen (Anemochorie) zurückzuführen sein könnten. Die hypogäischen Pilze wie z. B. *Tuber* spp. und die zu den resupinaten Thelephorales zählenden *Tomentella* spp. nutzen Zoochorie zur Verbreitung ihrer Sporen. Diese zu Hilfenahme von Tieren tritt vermehrt auf Böden mit geringer Störung durch ackerbauliche Maßnahmen auf (Lilleskov & Bruns 2005), so dass es ein dominantes Vorkommen der EM-Pilze *Tuber* spp. und *Tomentella* spp. erklärt. Auch in der Studie von Kaldorf et al. (2004) trat *Tomentella* spp. in einem Feldexperiment mit sieben Hybridaspkenklonen (*Populus tremula* L. × *P. tremuloides* Michx.) als dominant hervor. Vertreter beider Verbreitungstypen wurden auf den beiden untersuchten KUPs nachgewiesen.



Die grundlegenden standortspezifischen Unterschiede in der Dominanz einzelner Vertreter werden durch die standortspezifischen Einflüsse wie die Bodeneigenschaften, klimatischen Verhältnisse und die Entfernung zu weiteren Wirtspflanzen von geeigneten EM-Pilzpartnern als Besiedlungsquelle angesehen.

Eine Interaktion zwischen Rostpilzanfälligkeit und der EM-Rate konnte auf der KUP Uppsala nicht nachgewiesen werden. Auf der KUP Gülzow wurde nur für die EM-Pilzart *Scleroderma bovista* ein Einfluss der Faktoren Rostpilzanfälligkeit, Baumart sowie ihrer Interaktion auf die Mykorrhizierungsrate festgestellt (Tab. 3.12). *S. bovista* besiedelte wirtsspezifisch an den Pappelklonen Muhle Larsen (16,2% untersuchter Feinwurzelspitzen), Raspalje (21,6% untersuchter Feinwurzelspitzen) und Max 3 (11,3% untersuchter Feinwurzelspitzen) sowie am Weidenklon Nr. 6 mit 3,3% der untersuchten Feinwurzelspitzen, wobei diese EM-Rate vergleichsweise gering ausfiel (Tab. 3.8). Da zwei dieser Klone Rostpilz-anfällig und zwei -resistent sind, könnte sich die Besiedlung mit *S. bovista* ambivalent (parasitär, symbiotisch) auf die Wirtspflanze in Abhängigkeit von ihrer Resistenz bzw. Anfälligkeit gegen Rostpilzinfektionen auswirken und sie somit stärken oder schwächen. Allerdings zeigen Versuche mit *Scleroderma* Arten in Interaktion mit bspw. Termiten (Duponnois et al. 2006) oder Pflanzen positive Effekte wie ein verbessertes Pflanzenwachstum und eine erhöhte Biomasse (Duponnois et al. 2004; Turjaman et al. 2006; Oliveira et al. 2012; Sousa et al. 2014). Auch ein neutraler Effekt wurde bei Aggangan et al. (1996) beschrieben. Das in dieser Arbeit aufgetretene Vorkommen bzw. die Wirtswahl von *S. bovista* kann demnach keinen Rückschluss auf die Resistenz bzw. Anfälligkeit gegenüber Rostpilzinfektion geben.

#### **4.2.2 Blattchemie mykorrhizierter Pappel- und Weidenklone und ihre partielle Beeinflussung durch Rostpilzinfektion**

Die Ausbildung von Ektomykorrhizierung wird durch den Genotyp der Wirtspflanze und des Pilzes sowie durch Umweltbedingungen (z. B. pH-Wert und Bodenfeuchte) beeinflusst. Ektomykorrhizierung führt zum reziproken Transfer von C und Nährstoffen zwischen Wirtspflanze und Pilzpartner. Die N-Abgabe des Pilzpartners an die Wirtspflanze hängt wiederum vom C-Fluss der Pflanze an den Pilz ab (Kytöviita 2005). Nach Druebert et al. (2009) ist die Assimilatproduktionsleistung der Wirtspflanze der Grund für die EM-Diversität und nicht ihr Ergebnis. EM-Pilze stellen eine wichtige C *sink* an den Wurzeln dar, wodurch eine schnelle Bereitstellung aus photosynthetischen Aktivitäten in den Blättern erforderlich wird (Heinonsalo et al. 2004). Daher wurde bei den Feldversuchen in dieser Arbeit die Blattchemie (N, SA, CT, Chl<sub>t</sub>) auch im Hinblick auf eine mögliche Interaktion von Ektomykorrhizierung und Rostpilzinfektion untersucht.

Eine Veränderung der  $\text{Chl}_l$  Konzentration der Klone beider KUPs (Gülzow, Uppsala) konnte nicht festgestellt werden, obwohl die Häufigkeit der EM-Pilze sich als pflanzengenotypisch dominiert herausgestellt hat und innerhalb einer Art klonspezifisch variierte. Auch zwischen der Rostpilzanfälligkeit der Klone und der  $\text{Chl}_l$  Konzentration bestand kein signifikanter Zusammenhang.

Die N-Konzentrationen der Blätter lagen im natürlichen Schwankungsbereich der Pflanzen. So variierten die Konzentrationen in der KUP Gülzow zwischen  $16,4 \text{ mg N g}^{-1} \text{ TM}$  (Beaupré) und  $26,2 \text{ mg N g}^{-1} \text{ TM}$  (Raspalje); auch innerhalb der *S. viminalis* Klone (Uppsala) schwankten sie zwischen  $18,6 \text{ mg N g}^{-1} \text{ TM}$  (Ulv) und  $20,7 \text{ mg N g}^{-1} \text{ TM}$  (Gustav). Nach der Studie von Kopinga & van den Burg (1995), in der blattchemische Parameter wie N verschiedener Baumarten auf ihre optimale Konzentration getestet wurden, konnten die in den Klonen gemessenen N-Konzentrationen als ausreichend versorgt eingestuft werden. Kopinga & van den Burg (1995) bestätigen, dass die optimale N-Konzentration artspezifisch ist. Die Ergebnisse der Untersuchungen in der KUP Uppsala zeigten, dass klonspezifische N-Konzentrationen stets innerhalb der als artspezifisch optimal beschriebenen N Konzentration von *S. viminalis* lagen.

Bei der CT-Konzentration konnte ein Einfluss der Baumgattung in der KUP Gülzow festgestellt werden (Tab. 3.11). Die Konzentrationen der Weidenklone waren im Allgemeinen doppelt so hoch wie die der Pappelklone; die Ausnahmen bildeten hierbei die Weidenklone 78183 und *S. × dasyclados*. Auch in der KUP Uppsala wurden vergleichbar hohe Konzentrationen gemessen wie bei den Weidenklonen in Gülzow. Über hohe CT-Konzentrationen bei Weiden berichteten u. a. Glynn et al. (2004). Demnach sind im Allgemeinen bei *S. viminalis* Klonen höhere CT-Konzentrationen als bei anderen Weidenarten zu finden. *S. × dasyclados* Klone besitzen nach Glynn et al. (2004) geringere CT-Konzentrationen und mehr phenolische Glykoside, wodurch sie frosttoleranter sind.

Der Klon 78183 wies in der KUP Uppsala eine doppelt so hohe CT-Konzentration im Vergleich zur Konzentration in der KUP Gülzow auf (Tab. 3.5, 3.6). Da die Rostpilzanfälligkeit keinen Einfluss auf die CT-Konzentration gezeigt hat, scheint die Erklärung in standortspezifischen Unterschieden und damit auch der unterschiedlichen EM-Besiedlung zu liegen. Die EM-Rate in der KUP Gülzow am Klon 78183 war im Vergleich zum Klon 78183 in der KUP Uppsala doppelt so hoch und setzte sich vorwiegend aus *Tomentella* spp./*Russula* spp. und *Inocybe* spp. zusammen (Tab. 3.8, 3.10). In der KUP Uppsala wurden an diesem Klon hauptsächlich unterschiedliche EM-Pilze der Gattung *Tuber* und *Russula* gefunden, während *Inocybe* spp. vollkommen fehlte. Eine hohe CT-Konzentration sowie eine geringe EM-Rate auf der KUP Uppsala könnten in Übereinstimmung mit den bodenchemischen Eigenschaften der beiden Standorte auf eine bessere Nährstoffversorgung ohne Bedarf von Mykorrhizierung zurückzuführen sein. Dadurch kann die erhöhte Assimilatproduktion

unmittelbar und ohne Abzug durch assoziierte Mykorrhizapilze für die Produktion von Sekundärmetaboliten - wie CT - eingesetzt werden. Die Ergebnisse deuten darauf hin, dass ein möglicher Zusammenhang von Ektomykorrhizierung und Rostpilzinfektion eher auf nährstoffarmen und damit mykorrhizierungs-abhängigeren Standorten auftreten kann.

Erhöhte Konzentrationen von SA in den Blättern wurden im Gefäßversuch (vgl. Pfabel et al. 2012) in Reaktion auf Rostpilzinfektion ermittelt, so dass dieser Parameter auch in den Feldversuchen als Indikator für den Pathogenbefall herangezogen wurde. Die SA Konzentrationen waren in der KUP Uppsala standortspezifisch niedriger als in der KUP Gülzow (Tab. 3.5, 3.6). Rostpilzbefall unterliegt natürlichen Schwankungen, die von der Witterung abhängen. In der KUP Uppsala trat in der untersuchten Vegetationsperiode aufgrund der trockenen Witterungsverhältnisse kein Rostpilzbefall auf. Ein Zusammenhang zwischen SA Konzentration und klonspezifischer Rostpilzanfälligkeit aus Referenzdaten konnte in der KUP Uppsala nicht nachgewiesen werden. In der KUP Gülzow zeigte sich jedoch, dass die Baumart, die Rostpilzanfälligkeit sowie ihre Interaktion einen signifikanten Einfluss auf die SA-Konzentration in den Blättern haben (Tab. 3.11).

#### 4.2.3 Fazit

Pappeln (*Populus* spp.), Weiden (*Salix* spp.), Rostpilze (*Melampsora* spp.) und Mykorrhizapilze stehen im Fokus umfangreicher Forschungsprogramme. *Populus* spp. und *Melampsora larici-populina* (*Mlp*) wurden als Modellorganismen in vorangegangenen Untersuchungen sehr detailliert beschrieben. Auch die Kombinationen aus jeweils zwei dieser Organismen bzw. -gruppen wie z. B. der Pappelklon Beaupré und *Mlp* oder Weidenklone und Mykorrhizapilze wurden weitreichend auf ihre Interaktionen untersucht. Im Fokus der bisherigen Studien standen bei der Prüfung von Interaktionen zwischen Pappeln bzw. Weiden und Rostpilzen das Pathogenwachstum im Blatt und damit einhergehend die zeitliche Abfolge der Abwehrmechanismen und -substanzen in den Blättern der Wirtspflanze. Studien über die Interaktion zwischen Mykorrhizierung und Weiden bzw. Pappeln konzentrierten sich auf die Veränderungen der chemischen Zusammensetzung von der Wurzel bis zu den Blättern der Wirtspflanze, so dass Rückschlüsse auf das Wachstum und die Biomasse der Wirtspflanze gezogen werden konnten.

Die vorliegende Arbeit erweitert die Prüfung von Interaktionen erstmalig auf die Kombination von Mykorrhizapilzen als Symbiosepartnern, Weiden und Pappeln als Wirtspflanzen und Rostpilzen als Pathogenen. Im Modellversuch unter Einschränkung auf einen Mykorrhizapilzstamm, einen Pappelklon und ein Rostpilzisolat konnte unter definierten Umweltbedingungen die Mykorrhizierung die Wirtspflanze bei der Rostpilzabwehr

unterstützen. Dieser Prozess muss jedoch unter Freilandbedingungen bei Anwesenheit von variierenden Interaktionspartnern und Umweltbedingungen validiert werden.

Die Analyse der Ergebnisse zweier Feldversuche an Standorten mit einer Distanz von ca. 1000 km in Mittel- und Nordeuropa führte nicht zur Verifizierung der Ergebnisse der Modelluntersuchung, sondern bestätigte im Detail nur die in Voruntersuchungen beschriebene Abhängigkeit der dualen Interaktion zwischen Mykorrhizapilzen und Wirtspflanzen sowie Wirtspflanzen und Rostpilzen. Die Vielzahl der umweltbedingten Einwirkungen (z. B. Temperatur, Niederschlagsverlauf) auf die untersuchten Interaktionen sowie die Vielzahl nicht in dieser Untersuchung berücksichtigten weiteren biotischen Interaktionen (z. B. mit herbivoren Insekten oder Nematoden im Wurzelbereich) im Feldversuch werden als Ursache für dieses Ergebnis betrachtet. Da die genotypspezifische Neigung von Weiden- und Pappelklonen, wie sie bereits aus Voruntersuchungen bekannt ist, in den Feldversuchen bestätigt werden konnte, sollten Folgeuntersuchungen Genotypen mit definierter Rostpilzanfälligkeit innerhalb der gleichen Wirtspflanzenart über einen langjährigen Zeitraum untersuchen, um die umweltbedingten Variationen und zusätzlichen biotischen Interaktionen in der Wirkung von Mykorrhizierung auf die Rostpilzanfälligkeit abgrenzen zu können. Wenn sich die im Modellversuch gewonnenen Ergebnisse im Freiland verifizieren lassen, wären Weiden- und Pappelklone mit hoher Mykorrhizierungsneigung resistenter gegenüber Rostpilzbefall. Die Selektion stresstoleranter Weiden- und Pappelklone unter Berücksichtigung von multitrophen Interaktionen kann wertvolle Hinweise für die Züchtung nachhaltiger, leistungsstarker Sorten liefern.

## Zusammenfassung

Schnellwachsende Baumarten der Familie *Salicaceae* wie Pappeln (*Populus* spp.) und Weiden (*Salix* spp.) können unter natürlichen Bedingungen dual mykorrhiziert sein, d. h. sie bilden eine arbuskuläre Mykorrhizierung und eine Ektomykorrhizierung (EM) aus. Pappeln und Weiden werden in Kurzumtriebsplantagen (KUP) zur Energieholzverwertung angebaut. Zu den wirtschaftlich bedeutsamsten Krankheitserregern dieser Baumarten zählen die Rostpilze der Gattung *Melampsora* spp., die einen verfrühten Blattabfall und somit einen Biomasseverlust von bis zu 40% in Plantagen verursachen können. Ein weiteres Problem zeigt sich in dem natürlichen Phänomen, dass Resistenzen gegenüber Rostpilzen nach ca. 10 Jahren von Pathogenen mit veränderten Virulenzen überwunden werden können.

Bei der simultanen Besiedlung mit Ektomykorrhizapilzen und Rostpilzen auf Pappeln oder Weiden teilen sich diese Pilze die Assimilate der gemeinsamen Wirtspflanze, was zu einer Konkurrenzsituation führt. Die Interaktion zwischen EM und Rostpilzinfektion an der gleichen Wirtspflanze wurde bisher nicht untersucht, obwohl durch konkurrierende Assimilatnutzung der Pilze eine gegenseitige Beeinflussung vorhanden sein sollte. Ziel der vorliegenden Arbeit war daher die Untersuchung dualer Pilzbesiedlung an Wurzel und Blatt im definierten Modellversuch und die Validierung der Ergebnisse des Modellversuchs im Feld im Bewirtschaftungssystem Kurzumtrieb.

Im Modellversuch wurden der EM Pilzstamm *Hebeloma mesophaeum* (Pers.) Quélet MÜN, dem Rostpilzisolat (R) *Melampsora larici-populina* Kleb. (*Mlp*, Isolat 98AG31) Moÿ-de-l'Aisne, Frankreich sowie einem Rostpilz-anfälligen Pappelklon (*P. trichocarpa* × *deltoides* cv. 'Beaupré') unter optimalen Umweltbedingungen im Gewächshaus kombiniert. Die blattchemische Zusammensetzung wurde mittels photometrischer Analysen sowie Flüssig-Chromatographie-Tandem-Massenspektrometrie (LC-MS/MS) und Pyrolyse-Feldionisation Massenspektrometrie (Py-FIMS) nach viermonatiger Vegetationsperioden mit und ohne Pilzinokulation und mit einzelner und dualer Inokulation mit dem EM Pilzstamm und dem Rostpilzisolat untersucht.

Im Feldversuch wurden in Kurzumtriebsplantagen (KUP) sechs Pappelklone (drei resistent, drei anfällig gegen Rostpilzbefall) sowie sieben Weidenklone (drei anfällig, vier resistent) am Standort Gülzow (Deutschland) und sechs Weidenklone (drei anfällig, drei resistent) der Art *Salix viminalis* am Standort Uppsala (Schweden) auf ihre Mykorrhizierung, Rostpilzinfektion und Blattchemie untersucht. Zur Erfassung von Abundanz und Diversität der Ektomykorrhizierung erfolgte eine morphologisch-anatomische Charakterisierung der Feinwurzeln in Kombination der molekularbiologischen Identifikation der Pilzpartner (ITS-, LSU-Sequenzierung).

Rostpilzinfektion sowie EM-Besiedlung führten im Modellversuch zu einem erhöhten Anteil kondensierter Tannine an den Gesamtphenolen in den Blättern (13% in der Kontrolle, 18% bis 19% in den pilz-inokulierten Varianten). Weiterhin führte die singuläre Rostpilzinfektion (R) und in Kombination mit Ektomykorrhizierung (EM+R) zu erhöhten Konzentrationen von Salizylsäure in den Blättern (R:  $17,9 \mu\text{g g}^{-1}$ ; EM+R:  $25,4 \mu\text{g g}^{-1}$ ) im Vergleich zur Kontrolle ( $6,8 \mu\text{g g}^{-1}$ ). Rostpilzinfektion führte zu signifikanter Verringerung der Konzentration von fünf Flavonoiden sowie einem Lipid, die in der Pflanzenabwehr involviert sind. Ektomykorrhizierung führte im Modellversuch zu einer erhöhten Produktion von Sekundärmetaboliten, die zur Abwehr von Rostpilzinfektionen beitragen und lässt daher eine verbesserte Rostpilzresistenz an mykorrhizierten Pflanzen vermuten.

Im Feldversuch in der KUP Gülzow wurde die in der Literatur beschriebene gattungsspezifisch höhere Ektomykorrhizierungsrate an Pappel- gegenüber Weidenklonen bestätigt (Pappeln: 80,7%; Weiden: 36,7% der untersuchten Feinwurzelspitzen). Als Pilzpartner der Ektomykorrhizierung konnten innerhalb der Basidiomyceten *Inocybe* spp., *Scleroderma bovista*, *Scleroderma fuscum*, *Russula* spp. und ein kombinierter EM-Typ mit *Tomentella* spp. und *Russula* spp. identifiziert werden. Pezizales als Vertreter der Ascomyceten wurden nur an einem Weidenklon (*S. × dasyclados*) mit einer Besiedlungsrate von 1,5% der untersuchten Feinwurzelspitzen nachgewiesen. *Inocybe* spp. waren die dominierenden EM Pilzpartner von Pappel- und Weidenklonen; an Weidenklonen zählte auch der kombinierte Morphotyp mit Beteiligung der Pilzpartner *Tomentella* spp./*Russula* spp. zu den dominanten EM-Typen.

In der KUP Uppsala wiesen die *S. viminalis* Klone eine vergleichsweise geringe Ektomykorrhizierungsrate auf (Orm: 4,8% der untersuchten Feinwurzelspitzen; 78183: 18,6% der untersuchten Feinwurzelspitzen) wie dieses bereits für einen anderen *S. viminalis* Klon im Vergleich zu zwei deutschen Standorten von Baum et al. (2002) beschrieben wurde. Eine mögliche Ursache ist neben dem Einfluss des Genotyps, der Einfluss der Bodentextur. Ein hoher Tonanteil kann zu einer geringeren Ektomykorrhizierungs-Ausbildung an schnellwachsenden Baumarten führen (Baum et al. 2000). Die identifizierten Morphotypen konnten zu Ascomyceten (*Tuber rapaeodorum*, *Tuber* spp., *Geopora* spp.) und Basidiomyceten (*Tomentella botryoides*, *Truncatella* spp., *Russula laccata*, *Russula* spp.) zugeordnet werden. Dominierende EM-Pilzpartner waren *Russula* spp. und *Tuber* spp..

Ein Einfluss der Faktoren Rostpilzanfälligkeit, Baumart sowie ihrer Interaktion auf die Mykorrhizierungsrate wurde in der KUP Gülzow nur für die Pilzart *Scleroderma bovista* festgestellt. In Bezug auf die blattchemische Zusammensetzung konnte nur in der KUP

Gülzow ein signifikanter Einfluss der Rostpilzanfälligkeit auf die SA Konzentration ermittelt werden.

Die Ergebnisse der Feldversuche bestätigen den dominanten Einfluss des Wirtspflanzen-Genotyps auf die Mykorrhizierung. Das Beispiel *Scleroderma bovista* belegt, dass signifikante Zusammenhänge zwischen Mykorrhizierung und Rostpilzanfälligkeit in bestimmten Wirtspflanze-EM-Pilzpartner-Kombinationen möglich sind, jedoch in der Gesamtabundanz von Mykorrhizierung und Rostpilzbefall nicht nachgewiesen werden konnten. Es ist davon auszugehen, dass es in KUPs zu signifikanten Einflüssen der Mykorrhizierung auf den Rostpilzbefall kommen kann, dies jedoch von der Genotyp-Kombination (Wirtsklon-EM-Pilzpartner) und den Standortbedingungen abhängt.

## Summary

Fast growing tree species of the genus *Salicaceae* such as poplars (*Populus* spp.) and willows (*Salix* spp.) are able to form the both main types of mycorrhiza: arbuscular and ectomycorrhiza (EM). Poplars and willows are predominantly cultivated in short rotation coppice (SRC) for energy wood production. Hereby, the most economically important pathogens are rust fungi of the genus *Melampsora* spp. which can cause an early defoliation and thus, it results in an enormous loss of biomass (~ 40%) in SRC. A further problem is the natural phenomenon of resistance which can totally break down after about 10 years.

During the simultaneous colonisation of EM and rust fungus on poplars or willows, both fungi share assimilates of the same host plant which leads to a competitive situation. The interaction between EM colonisation and rust infection on the same host has not been studied, yet, although, it is probable that the competitive use of assimilates of fungi is affected by each other. Therefore, the aim of this thesis was to analyse the dual colonisation of fungi on leaves and roots in a defined model experiment and to validate the findings of the field experiments (model) in the management system of SRC.

In the model experiment, the EM fungus strain *Hebeloma mesophaeum* (Pers.) Quélet MÜN, the rust fungus isolate *Melampsora larici-populina* Kleb. (*Mlp*, isolate 98AG31) Moÿ-de-l'Aisne, France as well as a rust-susceptible poplar clone (*P. trichocarpa* × *deltoides* 'Beaupré') were cultivated in a greenhouse under natural conditions. After a four month growing season, the leaf chemical composition was measured with and without fungal inoculation as well as with single or dual inoculation of the EM fungus strain and the rust isolate by photometrical analyses, liquid chromatography-tandem mass spectrometry (LC-MS/MS) and pyrolysis-field ionization mass spectrometry (Py-FIMS).

In the field experiments, six poplar clones (three resistant, three susceptible) and seven willow clones (four resistant, three susceptible) of the SRC in Gülzow (Germany) and six *Salix viminalis* clones (three resistant, three susceptible) of the SRC in Uppsala (Sweden) were tested for mycorrhizal colonisation, rust infection and their leaf chemical composition. The abundance and the diversity of ectomycorrhiza as well as the morphological-anatomical characterisation of the fine roots were determined by molecular-biological identification of the fungal partners (ITS-, LSU-sequencing).

Both, rust infection and EM colonisation led to increased proportions of condensed tannins in relation to the total phenolics (13% in the control, 18% to 19% in the fungal treatments) in the model experiment. Furthermore, the single rust infection (R) and the combination with ectomycorrhiza (EM+R) led to the enhanced concentration of foliar salicylic acid (R: 17.9 µg



$\text{g}^{-1}$ ; EM+R:  $25.4 \mu\text{g g}^{-1}$ ) in comparison to the control ( $6.8 \mu\text{g g}^{-1}$ ). The rust infection caused a significantly decreased concentration of five flavonoids as well as one lipid which are involved in plant defence. The ectomycorrhizal colonisation resulted in an enhanced production of secondary metabolites, which contribute to the defence against rust infection in the model experiment, suggesting an improved rust resistance on mycorrhizal plants.

As described before in literature, the genus-specific proportion of ectomycorrhizal colonisation which was higher on poplar clones in comparison to willow clones (poplars: 80.7%; willows: 36.7% of examined fine-root tips) could be confirmed in the field experiment of the SRC Gülzow. As fungal partners of ectomycorrhiza, *Inocybe* spp., *Scleroderma bovista*, *Scleroderma fuscum*, *Russula* spp. and a combined EM-type of *Tomentella* spp. and *Russula* spp. could be identified between Basidiomycetes. Pezizales, as representative of Ascomycetes, was only found on one willow clone (*S. × dasyclados*) with a colonisation proportion of 1.5% of examined fine-root tips. *Inocybe* spp. were the dominant EM fungal partner on poplar and willow clones. A combined morphotype, which was as another dominant EM-type on willow clones, too, was among the fungal partners *Tomentella* spp. and *Russula* spp.

In the SCR Uppsala, *S. viminalis* clones have shown a comparatively low proportion of ectomycorrhizal colonisation (Orm: 4.8% of examined fine-root tips; 78183: 18.6% of examined fine-root tips) as already described for another *S. viminalis* clone in comparison to two study sites in Germany (Baum et al. 2002). Apart from the influence of genotype, this may be the influence of soil texture. A high proportion of clay can result in lower formation of ectomycorrhiza on fast-growing tree species (Baum et al. 2000). The identified morphotypes could be assigned to Ascomycetes (*Tuber rapaeodorum*, *Tuber* spp., *Geopora* spp.) and Basidiomycetes (*Tomentella botryoides*, *Truncatella* spp., *Russula laccata*, *Russula* spp.).

In the SRC Gülzow, the fungal species *Scleroderma bovista* was only affected by the factors rust-susceptibility, tree species as well as their interaction to the mycorrhizal proportion. In relation to the leaf chemical components, a significant influence could only be determined on the rust-susceptibility to the SA concentration in the SRC Gülzow.

In fact, the results of the field experiments confirm the dominant influence of the host plant genotype to the mycorrhizal colonisation. The example *Scleroderma bovista* give evidence for the possible significant relationship between mycorrhizal colonisation and rust-susceptibility of certain host plant-EM-fungal partner combination. However, it is not possible to provide evidence on the total abundance of mycorrhizal colonisation and rust infection. It can be assumed that rust infection could significantly be affected by mycorrhizal colonisation in some SRCs. But, this depends on the genotype combination (host clone-EM-fungal partner) as well as on the natural conditions.

## Literaturverzeichnis

- Agerer R** (1987-1998): Colour atlas of ectomycorrhizae. *Einhorn*, Schwäbisch Gmünd. Vol. 1-11.
- Agerer R** (1991): Characterisation of ectomycorrhiza. In: (eds.) Norris JR, Read DJ & Varma AK. Techniques for the study of Mycorrhiza. *Methods Microbiol.* 23:25-73.
- Agerer R** (2001): Exploration types of ectomycorrhizae - A proposal to classify ectomycorrhizal mycelial systems according to their patterns of differentiation and putative ecological importance. *Mycorrhiza* 11:107-114.
- Aggangan NS, Dell B & Malajczuk N** (1996): Effects of soil pH on the ectomycorrhizal response of *Eucalyptus urophylla* seedlings. *New Phytol.* 134:539-546.
- Altschul SF, Gish W, Miller W, Myers EW & Lipman DJ** (1990): Basic local alignment search tool. *J. Mol. Biol.* 215:403-410.
- Arnon DI** (1949): Copper enzymes in isolated chloroplasts. Polyphenoloxidase in *beta vulgaris*. *Plant Physiol.* 24:1-15.
- Azaiez A, Boyle B, Levée V & Séguin A** (2009): Transcriptome profiling in hybrid poplar following interactions with *Melampsora* rust fungi. *Mol. Plant Microbe. Interact.* 22:190-200.
- Baum C & Makeschin F** (2000): Effects of nitrogen and phosphorus fertilization on mycorrhizal formation of two poplar clones (*Populus trichocarpa* x *tremuloides*). *J. Plant Nutr. Soil Sci.* 163:491-497.
- Baum C, Schmid K & Makeschin F** (2000): Interactive effects of substrates and ectomycorrhizal colonization on growth of a poplar clone. *J. Plant Nutr. Soil Sci.* 163:221-226.
- Baum C, Weih M, Verwijst T & Makeschin F** (2002): The effects of nitrogen fertilization and soil properties on mycorrhizal formation of *Salix viminalis*. *Forest Ecol. Manag.* 160:35-43.
- Baum C, Toljander YK, Eckhardt K-U & Weih M** (2009): The significance of host-fungus combinations in ectomycorrhizal symbioses in the chemical quality of willow foliage. *Plant Soil* 323:213-224.
- Bennett RN & Wallsgrove RM** (1994): Secondary metabolites in plant defence mechanisms. *New Phytol.* 127:617-633.
- Boelcke B** (2006): Schnellwachsende Baumarten auf landwirtschaftlichen Flächen: Leitfaden zur Erzeugung von Energieholz. Ministerium für Ernährung, Landwirtschaft, Forsten und Fischerei Mecklenburg-Vorpommern, Schwerin.
- Bolton MD** (2009): Primary metabolism and plant defense - fuel for the fire. *Mol. Plant Microbe. Interact.* 22:487-497.

- Boyle B, Hamelin RC & Séguin A** (2005): *In vivo* monitoring of obligate biotrophic pathogen growth by kinetic PCR. *Appl. Environ. Microbiol.* 71:1546-1552. DOI:10.1128/AEM.71.3.1546-1552.2005.
- Bradshaw HD, Ceulemans R, Davis J & Stettler R** (2000): Emerging model systems in plant biology: poplar (*Populus*) as a model forest tree. *J. Plant Growth Regul.* 19:306-313. DOI: 10.1007/s003440000030.
- Bryant JB, Chapin FS III & Klein DR** (1983): Carbon/nutrient balance of boreal plants in relation to vertebrate herbivory. *Oikos* 40:357-368.
- BUND** (2010): Kurzumtriebsplantagen für die Energieholzgewinnung – Chancen und Risiken. BUNDPositionen 55.
- Cameron KD, Teece MA, Bevilacqua E & Smart LB** (2002): Diversity of cuticular wax among *Salix* species and *Populus* species hybrids. *Phytochemistry* 60:715-725.
- Ciszewska-Marciniak J & Jędryczka M** (2011): Life cycle and genetic diversity of willow rusts (*Melampsora* spp.) in Europe. *Acta Agrobotanica* 64(1):3-10.
- Conrath U, Pieterse CMJ & Mauch-Mani B** (2002): Priming in plant-pathogen interactions. *Trends Plant Sci.* 7(5):210-216.
- Day SD, Wiseman PE, Dickinson SB & Harris JR** (2010): Tree root ecology in the urban environment and implications for a sustainable rhizosphere. *Arboric. Urban. For.* 36(5):193-205.
- Dillen SY, Djomo SN, Al Afas N, Vanbeverem S & Ceulemans R** (2013): Biomass yield and energy balance of a short rotation poplar coppice with multiple clones on degraded land during 16 years. *Biomass Bioenerg.* 56:157-165. DOI: 10.1016/j.biombioe.2013.04.019.
- Dimitriou I, Mola-Yudego B & Aronsson P** (2012): Impact of Willow Short Rotation Coppice on Water Quality. *Bioenerg. Res.* 5:537-545. DOI: 10.1007/s12155-012-9211-5.
- Don A, Osborne B, Hastings A, Skiba U, Carter MS, Drewer J, et al.** (2012): Land-use change to bioenergy production in Europe: implications for the greenhouse gas balance and soil carbon. *GCB Bioenergy* 4:372-391. DOI: 10.1111/j.1757-1707.2011.01116.x.
- Duponnois R, Founoune H, Masse D & Pontanier R** (2004): Inoculation of *Acacia holosericea* with ectomycorrhizal fungi in a semiarid site in Senegal: growth response and influences on the mycorrhizal soil infectivity after 2 years plantation. *Forest Ecol. Manag.* 207:351-362. DOI: 10.1016/j.foreco.2004.10.060.
- Duponnois R, Assikbetse K, Ramanankierana H, Kisa M, Thioulouse J & Lepage M** (2006): Litter-forager termite mounds enhance the ectomycorrhizal symbiosis between *Acacia holosericea* A. Cunn. Ex G. Don and *Scleroderma dictyosporum* isolates. *FEMS Microbiol. Ecol.* 56:292-303. DOI:10.1111/j.1574-6941.2006.00089.x.

- Druebert C, Lang C, Valtanen K & Polle A** (2009): Beech carbon productivity as driver of ectomycorrhizal abundance and diversity. *Plant Cell Environ.* 32:992-1003.
- Durner J, Shan J & Klessig DF** (1997): Salicylic acid and disease resistance in plants. *Trends Plant Sci.* 2:266-274.
- Durrant WE & Dong X** (2004): Systemic acquired resistance. *Annu. Rev. Phytopathol.* 42:185–209. DOI: 10.1146/annurev.phyto.42.040803.140421.
- Ek H** (1997): The influence of nitrogen fertilization on the carbon economy of *Paxillus involutus* in ectomycorrhizal association with *Betula pendula*. *New Phytol.* 135:133-142.
- Fachagentur nachwachsender Rohstoffe e.V. (FNR)** (2013): Jahresbericht 2012/2013, Gülzow-Prüzen.
- Facchini PJ, Hagel J & Zulak KG** (2002): Hydroxycinnamic acid amide metabolism physiology and biochemistry. *Can. J. Bot.* 80:577–589.
- Floudas D, Binder M, Riley R, Barry K, Blanchette RA, Henrissat B, Martinez AT, Otilar R, Spatafora JW, Yadav JS, et al.** (2012): The paleozoic origin of enzymatic lignin decomposition reconstructed from 31 fungal genomes. *Science* 336(6089):1715–1719.
- Frey P, Gérard PR, Feau N, Husson C & Pinon J** (2005): Variability and population biology of *Melampsora* rusts on poplars. In: (eds.) Pei MH & McCracken AR. Rust diseases of willow and poplar. *CAB International*, Wallingford, UK, pp. 63-72.
- Gardes M & Bruns T** (1993): ITS primers with enhanced specificity for Basidiomycetes: Application to the identification of mycorrhizae and rusts. *Mol. Ecol.* 2:113-118.
- Georgi R, Helbig C, Müller M, Graichen K & Schubert M** (2013): Blattwespen-Massenvermehrung in Kurzumtriebsplantagen mit Pappel. *AFZ-Der Wald* 4:14-16.
- Gérard PR, Husson C, Pinon J & Frey P** (2006): Comparison of genetic and virulence diversity of *Melampsora larici-populina* populations on wild and cultivated poplar and influence of the alternate host. *Phytopathology* 96(9):1027-36. DOI: 10.1094/PHYTO-96-1027.
- Giorcelli A, Vietto L, Anselmi N & Gennaro M** (1996): Influence of clonal susceptibility, leaf age and inoculum density on infections by *Melampsora larici-populina* races E1 and E3. *Eur. J. For. Path.* 26:323-331.
- Glynn C, Rönnerberg-Wästljung A-C, Julkunen-Tiitto R & Weih M** (2004): Willow genotype, but not drought treatment, affects foliar phenolic concentrations and leaf-beetle resistance. *Entomol. Exp. Appl.* 113:1-14.
- Gross D & Parthier B** (1994): Novel natural substances acting in plant growth regulation. *J. Plant Growth Regul.* 13:93-114.
- Gullberg U & Ryttman H** (1993): Genetics of field resistance to *Melampsora* in *Salix viminalis*. *Eur. J. For. Path.* 23:75-84.

- Gurgel A** (2013): Ergebnisse der Versuche mit schnellwachsenden Baumarten nach 18 Jahren Bewirtschaftung in Gülzow. Landesforschungsanstalt für Landwirtschaft und Fischerei Mecklenburg-Vorpommern.
- Hammerschmidt R** (1999): Induced disease resistance: how do induced plants stop pathogens? *Physiol. Mol. Plant. Pathol.* 55:77-84.
- Hamzeh M & Dayanandan S** (2004): Phylogeny of *Populus* (Salicaceae) based on nucleotide sequences of chloroplast *trnT-trnF* region and nuclear rDNA. *Am. J. Bot.* 91(9):1398-1408.
- Hanley SJ, Pei MH, Powers SJ, Ruiz C, Mallott MD, Barker JHA & Karp A** (2011): Genetic mapping of rust resistance loci in biomass willow. *Tree Genet. Genomes* 7:597-608. DOI: 10.1007/s11295-010-0359-x.
- Haug I** (2002): Identification of *Picea*-ectomycorrhizae by comparing DNA-sequences. *Mycol. Prog.* 1:167-178.
- Hauk S, Wittkopf S & Knoke T** (2014): Analysis of commercial short rotation coppices in Bavaria, southern Germany. *Biomass Bioenerg.* 67:401-412. DOI: 10.1016/j.biombioe.2014.05.027.
- Heinonsalo J, Hurme K-R & Sen R** (2004): Recent <sup>14</sup>C-labelled assimilate allocation to Scots pine seedling root and mycorrhizosphere compartments developed on reconstructed podzol humus, E- and B- mineral horizons. *Plant Soil* 259:111-121.
- Helbig C, Georgi R & Müller M** (2013): Die Weidenblattkäfer an Weiden und Pappeln im Kurzumtrieb. *AFZ-Der Wald* 4:17-19.
- Hendricks JJ, Aber JD, Nadelhoffer KJ & Hallett RD** (2000): Nitrogen controls on fine root substrate quality in temperate forest ecosystems. *Ecosystems* 3:57-69.
- Hiscox JD & Israelstam GF** (1979): A method for the extraction of chlorophyll from leaf tissue without maceration. *Can. J. Bot.* 57:1332-1334.
- Holdenrieder O, Rudow A & Aas G** (1999): Die Gattung *Salix*. Eine Einführung in die Vielfalt, Biologie und Ökologie der Weiden. *Schweiz. Z. Forstwes.* 150(11):405-411.
- Horton TR & Bruns TD** (2001): The molecular revolution in ectomycorrhizal ecology: peeking into the black-box. *Mol. Ecol.* 10:1855-1871.
- Hryniewicz K, Haug I & Baum C** (2008): Ectomycorrhizal community structure under willows at former ore mining sites. *Europ. J. Soil Biol.* 44:37-44. DOI: 10.1007/s00572-012-0437-z.
- Hryniewicz K, Baum C, Leinweber P, Weih M & Dimitriou I** (2010): The significance of rotation periods for mycorrhiza formation in Short Rotation Coppice. *Forest Ecol. Manag.* 260:1943-1949.
- Hryniewicz K, Toljander YK, Baum C, Fransson PMA, Taylor AFS & Weih M** (2012): Correspondence of ectomycorrhizal diversity and colonisation of willows (*Salix* spp.)

- grown in short rotation coppice on arable sites and adjacent natural stands. *Mycorrhiza* 22:603-13. DOI: 10.1007/s00572-012-0437-z.
- Johnson JD & Kim Y** (2005): The role of leaf chemistry in *Melampsora medusae* infection of hybrid poplar: effects of leaf development and fungicide treatment *Can. J. For. Res.* 35:763-771. DOI: 10.1139/X05-009.
- Jabaji-Hare S, Chamberland H & Charest PM** (1999): Cell wall alterations in hypocotyls of bean seedlings protected from *Rhizoctonia* stem canker by a binucleate *Rhizoctonia* isolate. *Mycol. Res.* 103:1035-1043.
- Kahle P & Boelcke B** (2004): Auswirkungen des Anbaus schnellwachsender Baumarten im Kurzumtrieb auf ausgewählte Bodeneigenschaften. *Bornimer Agrartechnische Berichte* 35:99-108.
- Kaldorf M, Renker C, Fladung M & Buscot F** (2004): Characterization and spatial distribution of ectomycorrhizas colonizing aspen clones released in an experimental field. *Mycorrhiza* 14:295-306. DOI: 10.1007/s00572-003-0266-1.
- Kogel KH, Beckhove U, Dreschers J, Munch S & Romme Y** (1994): Acquired resistance in barley - The resistance mechanism induced by 2,6-Dichloroisonicotinic acid is a phenocopy of a genetically based mechanism governing race-specific powdery mildew resistance. *Plant Physiol.* 106:1269-1277.
- Kopinga J & van den Burg J** (1995): Using soil and foliar analysis to diagnose the nutritional status of urban trees. *J. Arboric.* 21:17-24.
- Kottke I, Guttenberger M, Hampp R & Oberwinkler F** (1987): An *in vitro* method for establishing mycorrhizae on coniferous tree seedlings. *Trees* 1:191-194.
- Kraus TEC, Zasoski RJ & Dahlgren RA** (2004): Fertility and pH effects on polyphenol and condensed tannin concentrations in foliage and roots. *Plant Soil* 262:95-109.
- Kröber M, Heinrich J & Wagner P** (2014): Kurzumtriebsplantagen könnten 2015 interessant werden. Bauernblatt 47-48. Download unter: <http://www.energieholz-portal.de/358-0-Publikationen.html>.
- Kuzovkina YA, Weih M, Abalos Romero M, Belyaeva I, Charles J, Hurst S, Karp A, Labrecque M, McIvor I, Singh NB, Smart L, Teodorescu T, Trybush S & Volk T** (2008): *Salix*: Botany and Global Horticulture. *Horticultural Reviews* 34:447-489.
- Kytöviita M-M** (2005): Asymmetric symbiont adaptation to arctic conditions could explain why high arctic plants are non-mycorrhizal. *FEMS Microbiol. Ecol.* 53:27-32.
- Landgraf D & Helbig C** (2010): Pappelblattrost in Kurzumtriebsplantagen. *AFZ-Der Wald* 8:46-47.
- Lascoux M, Ramstedt M, Åström B & Gullberg U** (1996): Components of resistance of leaf rust (*Melampsora laricis epitea* Kleb./*Melampsora ribesii-viminalis* Kleb.) in *Salix viminalis* L.. *Theor. Appl. Genet.* 93:1310-1318.

- Laurans F & Pilate G** (1999): Histological aspects of a hypersensitive response in poplar to *Melampsora larici-populina*. *Phytopathology* 89:233-238.
- Lehto T & Zwiazek JJ** (2011): Ectomycorrhizas and water relations of trees: a review. *Mycorrhiza* 21:71-90.
- Lilleskov EA & Bruns TD** (2005): Spore dispersal of a resupinate ectomycorrhizal fungus, *Tomentella subulilacina*, via soil food webs. *Mycologia* 97:762-769.
- Lin D, Hubbes M & Zsuffa L** (1994): Differentiation of poplar and willow clones using RAPD fingerprints. *Tree Physiol.* 14:1097-1105.
- Lin S-Z, Zhang Z-Y, Zhang Q & Lin Y-Z** (2006): Progress in the study of molecular genetic improvements of poplar in China. *J. Integr. Plant Biol.* 48:1001-1007.
- Lockwell J, Guidi W & Labrecque M** (2012): Soil carbon sequestration potential of willows in short-rotation coppice established on abandoned farm lands. *Plant Soil* 360:299-318. DOI: 10.1007/s11104-012-1251-2.
- Major IT, Nicole M-C, Duplessis S & Séguin A** (2010): Photosynthetic and respiratory changes in leaves of poplar elicited by rust infection. *Photosynth. Res.* 104:41-48.
- Marx M** (2012): „Rechtlicher Rahmen und Fördermöglichkeiten bei KUP“ (Vortrag), Sächsisches Staatsministerium für Umwelt und Landwirtschaft, Referat 33, Pflanzliche Erzeugnisse, Landwirtschaftlicher Ressourcenschutz.
- Mc Cracken AR & Dawson WM** (2003): Rust disease (*Melampsora epitea*) of willow (*Salix* spp.) grown as short rotation coppice (SRC) in inter- and intra-species mixtures. *Ann. Appl. Biol.* 143:381-393.
- Mellway RD, Tran LT, Prouse MB, Campbell MM & Constabel CP** (2009): The wound-, pathogen-, and ultraviolet B-responsive *MYB134* gene encodes an R2R3 MYB transcription factor that regulates proanthocyanidin synthesis in poplar. *Plant Physiol.* 150:924-941.
- Miranda M, Ralph SG, Mellway R, White R, Heath MC, Bohlmann J & Constabel CP** (2007): The transcriptional response of hybrid poplar (*Populus trichocarpa* × *P. deltoides*) to infection by *Melampsora medusae* leaf rust involves induction of flavonoid pathway genes leading to the accumulation of proanthocyanidins. *Mol. Plant Microbe Interact.* 20:816-831.
- Nehls U, Grunze N, Willmann M, Reich M & Küster H** (2007): Sugar for my honey: carbohydrate partitioning in ectomycorrhizal symbiosis. *Phytochemistry* 68:82-91.
- Nehls U, Göhringer F, Wittulsky S & Dietz S** (2010): Fungal carbohydrate support in the ectomycorrhizal symbiosis: a review. *Plant Biol.* 12:292-301. DOI: 10.1111/j.1438-8677.2009.00312.x.

- O'Donnell K** (1993): *Fusarium* and its near relatives. In: (eds.) Reynolds DR & Taylor JW. The fungal holomorph: mitotic, meiotic and pleomorphic speciation in fungal systematics. *CAB International*, Washington. pp. 225-233.
- Oliveira RS, Franco AR & Castro PML** (2012): Combined use of *Pinus pinaster* plus and inoculation with selected ectomycorrhizal fungi as an ecotechnology to improve plant performance. *Ecol. Eng.* 43:95-103.
- Pei MH** (2005): A brief review of *Melampsora* rusts on *Salix*. In: Rust diseases of willow and poplar. *CAB Inter*, Wallingford, UK.
- Pei MH, Royle DJ & Hunter T** (1996): Pathogenic specialization of *Melampsora epitea* var. *epitea* on *Salix*. *Plant Pathol.* 45:679-690.
- Pei MH, Ruiz C, Bayon C & Hunter T** (2004): Rust resistance in *Salix* to *Melampsora larici-epitea*. *Plant Pathol.* 53:770-779.
- Pfabel C, Eckhardt K-U, Baum C, Struck C, Frey P & Weih M** (2012): Impact of ectomycorrhizal colonisation and rust infection on the secondary metabolism of poplar (*Populus trichocarpa* × *deltoides*). *Tree Physiol.* 32:1357-64. DOI: 10.1093/treephys/tps093.
- Phillips R** (1998): Der große Kosmos-Naturführer Pilze. Kosmos Verlag. Vol. 3.
- Pieterse CMJ & van Loon LC** (1999): Salicylic acid-independent plant defence pathways. *Trends Plant Sci.* 4(2):52-58.
- Pinon J & Frey P** (2005): Interactions between poplar clones and *Melampsora* populations and their implications for breeding for durable resistance. In: (eds.) Pei MH & McCracken AR. Rust diseases of willow and poplar. *CAB International*, Wallingford, UK, pp. 139-154.
- Pinon J, Frey P & Husson C** (2006): Wettability of poplar leaves influences dew formation and infection by *Melampsora larici-populina*. *Plant Dis.* 90:177-184. DOI: 10.1094/PD-90-0177.
- Porter LJ, Hrstich LN & Chan BG** (1986): The conversion of procyanidins and prodelphinidins to cyaniding and delphinidin. *Phytochemistry* 25:223-230.
- Ramstedt M** (1999): Rust disease on willows - virulence variation and resistance breeding strategies. *Forest Ecol. Manag.* 121:101-111.
- Richardson AD, Duigan SP & Berlyn GP** (2002): An evaluation of noninvasive methods to estimate foliar chlorophyll content. *New Phytol.* 153:185-194.
- Rinaldi C, Kohler A, Frey P, Duchaussoy F, Ningre N, Couloux A, Wincker P, Le Thiec D, Fluch S, Martin F & Duplessis S** (2007): Transcript profiling of poplar leaves upon infection with compatible and incompatible strains of the foliar rust *Melampsora larici-populina*. *Plant Physiol.* 144:347-366.



- Röhrich C, Grunert M & Ruscher K** (2011): Kurzumtriebsplantage Köllitsch: Etablierung einer Energieholzplantage im Lehr- und Versuchsgut Köllitsch des Sächsischen Landesamtes für Umwelt, Landwirtschaft und Geologie, Schriftenreihe des LfULG 33.
- Rönnberg-Wästljung AC, Samils B, Tsarouhas V & Gullberg U** (2008): Resistance to *Melampsora larici-epitea* leaf rust in *Salix*: analyses of quantitative trait loci. *J. Appl. Genet.* 49(4):321-331.
- Rouhier N, Gelhaye E, Gualberto JM, Jordy M-N, De Fay E, Hirasawa M, Duplessis S, Lemaire SD, Frey P, Martin F, Manieri W, Knaff DB & Jacquot J-P** (2004): Poplar peroxiredoxin Q. A thioredoxin-linked chloroplast antioxidant functional in pathogen defense. *Plant Physiol.* 134:1027-1038.
- Ruuhola TM, Sipura M, Nousiainen O & Tahvanainen J** (2001): Systemic induction of salicylates in *Salix myrsinifolia* (Salisb.). *Ann. Bot.-London* 88:483-497. DOI: 10.1006/anbo.2001.1491.
- Samils B, Rönnberg-Wästljung AC & Stenlid J** (2011): QTL mapping of resistance to leaf rust in *Salix*. *Tree Genet. Genomes* 7:1219-1235. DOI: 10.1007/s11295-011-0408-0.
- Scalbert A, Monties B & Janin G** (1989): Tannins in wood: comparison of different estimation methods. *J. Agric. Food Chem.* 37:1324-1329.
- Scheffer F & Schachtschabel P** (2010): Lehrbuch der Bodenkunde. (eds.) Blume H-P, Brümmer GW, Horn R, Kandeler E, Kögel-Knabner I, Kretschmar R, Stahr K & Wilke B-M. *Spektrum Akademischer Verlag*, Heidelberg. Vol. 16, p. 151.
- Schlichting A & Leinweber P** (2009): New evidence for the molecular-chemical diversity of potato plant rhizodeposits obtained by pyrolysis-field ionization mass spectrometry. *Phytochem. Analysis.* 20:1-13.
- Schulten H-R** (1996): Direct pyrolysis-mass spectrometry of soils: a novel tool in agriculture, ecology, forestry and soil science. In: (eds.) Yamasaki S & Boutton TW. Mass spectrometry of soils. *Marcel Dekker*, New York. pp. 373-436.
- Schütte A** (2012): Pflanzen für Industrie und Energie. Fachagentur nachwachsender Rohstoffe e.V. (FNR), Gülzow-Prüzen.
- Smith SE & Read DJ** (2008): Mycorrhizal symbiosis. 3<sup>rd</sup> Edition. *Academic Press*.
- Sousa NR, Franco AR, Oliveira RS & Castro PML** (2014): Reclamation of an abandoned burned forest using ectomycorrhizal inoculated *Quercus rubra*. *Forest Ecol. Manag.* 320: 50-55. DOI: org/10.1016/j.foreco.2014.02.033.
- Stadnik MJ & Buchenauer H** (2000): Inhibition of phenylalanine ammonia-lyase suppresses the resistance induced by benzothiadiazole in wheat to *Blumeria graminis* f. sp. *tritici*. *Physiol. Mol. Plant Pathol.* 57:25-34.
- Steenackers J, Steenackers M, Steenackers V & Stevens M** (1996). Poplar diseases, consequences on growth and wood quality. *Biomass Bioenerg.*, 10(5-6):267-274.

- Tabbush P & Beaton A** (1998): Hybrid poplars: present status and potential in Britain. *Forestry*. 71:355-364.
- Tian C, Zhao P & Cao Z** (2009): Role of cell wall degrading enzymes in the interaction of poplar and *Melampsora larici-populina* Kleb. *Front For China* 4:111-116.
- Toome M, Heinsoo K & Luik A** (2006): Abundance of willow rust (*Melampsora* sp.) on different willow clones in Estonian energy forest plantations. *Proc. Estonian Acad. Sci. Biol. Ecol.* 55:208-317.
- Turjaman M, Tamai Y, Segah H, Limin SH, Osaki M & Tawaraya K** (2006): Increase in early growth and nutrient uptake of *Shorea seminis* seedlings inoculated with two ectomycorrhizal fungi. *J. Trop. For. Sci.* 18(4):243-249.
- Tsai C-J, Harding SA, Tschaplinski TJ, Lindroth RL & Yuan Y** (2006): Genome-wide analysis of the structural genes regulating defense phenylpropanoid metabolism in *Populus*. *New Phytol.* 172:47-62. DOI: 10.1111/j.1469-8137.2006.01798.x.
- Von Wühlisch G** (2000): Bericht über Aktivitäten bei dem Anbau und der Nutzung von Pappeln, Aspen und Weiden in der Bundesrepublik Deutschland (1996-1999). Bundesministerium für Ernährung, Landwirtschaft und Verbraucherschutz (BMELV), Bonn.
- Von Wühlisch G** (2012): Pappeln und Weiden in Deutschland: Bericht der Nationalen Pappelkommission (2008-2011). Bundesministerium für Ernährung, Landwirtschaft und Verbraucherschutz (BMELV), Bonn.
- Wang B & Qiu Y-L** (2006): Phylogenetic distribution and evolution of mycorrhizas in land plants. *Mycorrhiza* 16:299-363. DOI 10.1007/s00572-005-0033-6.
- White TJ, Bruns T, Lee S & Taylor JW** (1990): Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics. In: (eds.) Innis MA, Gelfand DH, Sninsky JJ & White TJ. PCR Protocols: A Guide to Methods and Applications. *Academic Press*, Inc., New York. pp. 315-322.
- Wickham J, Rice B, Finnan J & McConnon R** (2010): A review of past and current research on short rotation coppice in Ireland and abroad. COFORD, National Council for Forest Research and Development, Dublin, Ireland.
- Witzell J & Martin JA** (2008): Phenolic metabolites in the resistance of northern forest trees to pathogens – past experiences and future prospects. *Can. J. Forest Res.* 38:2711-2727.
- Worrall JJ, Anagnost S & Zabel R** (1997): Comparison of wood decay among diverse lignicolous fungi. *Mycologia* 89:199-219.
- Zhao S & Qi X** (2008): Signalling in plant disease resistance and symbiosis. *J. Integr. Plant Biol.* 50:799-807.

## Internetnachweise

**Bundesamt für Güterverkehr (BAG).** Förderprogramm „De-minimis“, abrufbar unter:  
[http://www.bag.bund.de/DE/Navigation/Foerderprogramme/Deminimis/deminimis\\_node.html](http://www.bag.bund.de/DE/Navigation/Foerderprogramme/Deminimis/deminimis_node.html) [letzter Zugriff: 15.12.2014]

**Bundesministerium für Ernährung und Landwirtschaft** (2014, BMEL). Gemeinschaftsaufgabe Agrarstruktur & Küstenschutz - GAK-Rahmenplan 2014, abrufbar unter:  
[http://www.bmel.de/DE/Landwirtschaft/Foerderung-Agrarsozialpolitik/GAK/\\_Texte/GAK-Rahmenplan2014.html](http://www.bmel.de/DE/Landwirtschaft/Foerderung-Agrarsozialpolitik/GAK/_Texte/GAK-Rahmenplan2014.html) [letzter Zugriff: 15.12.2014]

**Fachagentur nachwachsende Rohstoffe (FNR).** Förderung von Kurzumtriebsplantage in den Bundesländern (Stand: 2011/2012), abrufbar unter:  
<http://energiepflanzen.fnr.de/pflanzen/mehrjaehrige/energieholz/kup-foerderung/> [letzter Zugriff: 15.12.2014]

**Spektrum Akademischer Verlag** (2001). Abrufbar unter:  
<http://www.wissenschaft-online.de/abo/lexikon/biok/7904> [letzter Zugriff: 15.12.2014]

**Zinovjev AG & Kadis I** (2007-2010). Willows of Massachusetts, Salicicola projects, abrufbar unter: <http://www.salicicola.com/checklists/salix/MA/> [letzter Zugriff: 15.12.2014]

## Anhang

**A1:** Rostpilze der Gattung *Melampsora* spp., die hauptsächlich in Weiden- und Pappelplantagen vorkommen. (die Liste erhebt keinen Anspruch auf Vollständigkeit)

Gattung	Art/Klon	<i>Melampsora</i>	f. sp.	Referenz
<b>Salix</b>	<i>S. aurita</i> L.	<i>M. larici – epitea</i> Kleb.	<i>larici – epitea typica</i> Kleb.	Pei 2005
	<i>S. caprea</i> L.			
	<i>S. cinerea</i> L.			
	<i>S. daphnoides</i> Vill.			
	<i>S. × dasyclados</i> Wimm.			
	<i>S. purpurea</i> L.			
	<i>S. viminalis</i> L.			
	<i>S. viminalis</i> L.	<i>M. ribesii-viminalis</i> Kleb.		Lascoux et al. 1996
	<i>S. alba</i> L.	<i>M. salicis-albae</i> Kleb. (= <i>M. allii-salicis-albae</i> Kleb.)		Gäumann, 1959 zitiert in Pei 2005
	<i>S. aurita</i> L.	<i>M. abietis-caprearum</i> Tubeuf.		Gäumann, 1959 zitiert in Pei 2005
	<i>S. caprea</i> L.	(= <i>M. humboldtiana</i> Speg.)		
	<i>S. cinerea</i> L.			
	<i>S. purpurea</i> L.			
	<i>S. aurita</i> L.	<i>M. larici-caprearum</i> Kleb. (=		Gäumann, 1959 zitiert in Pei 2005
	<i>S. caprea</i> L.	<i>M. caprearum</i> Thüm.)		
	<i>S. cinerea</i> L.			

Gattung	Art/Klon	<i>Melampsora</i>	f. sp.	Referenz
	<i>S. aurita</i> L. <i>S. caprea</i> L. <i>S. cinerea</i> L. <i>S. viminalis</i> L.	<i>M. larici-epitea</i> Kleb.	<i>larici-epitea typica</i> Kleb.	Sydow & Sydow 1915 und Gäumann, 1959 zitiert in Pei 2005
	<i>S. daphnoides</i> Vill.	<i>M. larici-epitea</i> Kleb.	<i>larici-daphnoides</i> Kleb.	Sydow & Sydow 1915 und Gäumann, 1959 zitiert in Pei 2005
	<i>S. daphnoides</i> Vill. <i>S. purpurea</i> L. <i>S. aurita</i> L.	<i>M. larici-epitea</i> Kleb.	<i>larici-purpureae</i> Schneid.	Sydow & Sydow 1915 und Gäumann 1959 zitiert in Pei 2005
	<i>S. × dasyclados</i> Wimm.	<i>M. larici-epitea</i> Kleb.	<i>larici-retusae</i> Fischer	Gäumann 1959 zitiert in Pei 2005
	<i>S. aurita</i> L.	<i>M. ribesii-epitea</i> Kleb.	<i>ribesii-auritae</i> Kleb. <i>ribesii-grandifoliae</i> Schneid.	Gäumann 1959 zitiert in Pei 2005
	<i>S. aurita</i> L. <i>S. caprea</i> L. <i>S. cinerea</i> L.	<i>M. euonymi-caprearum</i> Kleb.	<i>typica</i> Kleb.	Gäumann 1959 zitiert in Pei 2005
	<i>S. fragilis</i> L.	<i>M. allii-fragilis</i> Kleb.		Sydow & Sydow 1915 und Gäumann 1959 zitiert in Pei 2005

Gattung	Art/Klon	Melampsora	f. sp.	Referenz
	<i>S. fragilis</i> L.	<i>M. galanthi-fragilis</i> Kleb.		Sydow & Sydow 1915 und Gäumann 1959 zitiert in Pei 2005
	<i>S. purpurea</i> L.	<i>M. ribesii-purpurea</i> Kleb.		Gäumann 1959 zitiert in Pei 2005
<b>Populus</b>	<i>P. × euramericana</i> 'Robusta', 'Bellini', 'Luisa Avanzo'	<i>M. larici-populina</i> Kleb.		Rouhier et al. 2004; Laurans & Pilate 1999; Rinaldi et al. 2007; Boyle et al. 2005; Giorcelli et al. 1996
	<i>P. trichocarpa</i> Torr. and Gray × <i>P. deltoides</i> Bartr. ex Marsh. 'Beaupré'			
	<i>P. deltoides</i> Bartr. ex Marsh. × <i>P. nigra</i> L. 'Ogy'			
	<i>P. nigra</i> L. × <i>P. maximowiczii</i>			
	<i>P. tremula</i> L. × <i>P. alba</i> L.			
	<i>P. balsamifera</i> L. × <i>P. deltoides</i> Marsh			
	<i>P. trichocarpa</i> Torr. and Gray × <i>P. deltoides</i> Bartr. ex Marsh.	<i>M. medusae</i> Thüm.		Miranda et al. 2007
	<i>P. nigra</i> L. × <i>P. maximowiczii</i> 'Henry'	<i>M. medusae</i> Thüm.	<i>deltoides</i>	Azaiez et al. 2008; Boyle et al. 2005
	<i>P. balsamifera</i> L. × <i>P. deltoides</i> Marsh 'Jackii'			

**A2:** Mittelwerte (mit Stabw) der Rostpilzbonitur 2011 von Weiden- und Pappelklonen der KUP Gülzow. Die Bonitur wurde von der LFA Gülzow nach den Richtlinien des Bundessortenamts durchgeführt; hohe Zahlenwerte bedeuten hierbei eine hohe Anfälligkeit.  $n = 4$ .

Klon	Bonitur
Muhle Larsen	7 (0) <sup>cde</sup>
Raspalje	8,5 (1) <sup>e</sup>
Beaupré	8 (1,4) <sup>de</sup>
Max 2	3,5 (1) <sup>abc</sup>
Max 3	3,5 (1) <sup>abc</sup>
Max 4	5 (0) <sup>bcde</sup>
78183	7 (0) <sup>cde</sup>
<i>Salix</i> × <i>dasyclados</i>	6 (3,5) <sup>cde</sup>
Weide 8	4,3 (1,2) <sup>abcd</sup>
78021	5 (0) <sup>bcde</sup>
78101	6 (2,6) <sup>cde</sup>
<i>Salix viminalis</i>	2 (1,2) <sup>ab</sup>
Weide 6	1 (0) <sup>a</sup>

**A3:** Taxonomische Auflistung der zur Myzelvermehrung kultivierten EM-Pilze bzw. der bei den Freilandversuchen identifizierten EM-Pilze (beides fett markiert). Die Taxonomie richtet sich nach der NCBI Datenbank, Stand 15.12.2014.

Eukaryota (*Domäne*)

Fungi (*Reich*)

Dikarya (*Unterreich*)

**Ascomycota** (*Stamm*)

Pezizomycetes (*Klasse*)

**Pezizales** (*Ordnung*)

Pyronemataceae (*Familie*)

➔ **Geopora**

Tuberaceae (*Familie*)

➔ **Tuber**  
**T. rapaeodorum**

Sordariomycetes (*Klasse*)

Xylariales (*Ordnung*)

Amphisphaeriaceae (*Familie*)

➔ **Truncatella** (*Gattung*)



Fortsetzung A3

## **Basidiomycota** (*Stamm*)

Agaricomycetes (*Klasse*)

Agaricales (*Ordnung*)

Cortinariaceae

- ➔ **Cortinarius**
- ➔ *Hebeloma*  
***H. leucosarx***  
***H. mesophaeum***

Inocybaceae (*Familie*)

- ➔ ***Inocybe***  
***I. geophylla***

Tricholomataceae

- ➔ *Laccaria*  
***L. laccata***
- ➔ *Tricholoma*  
***T. argyraceum***

Boletales (*Ordnung*)

Paxillaceae (*Familie*)

- ➔ *Paxillus*  
***P. involutus***

Sclerodermataceae (*Familie*)

- ➔ ***Scleroderma***  
***S. fuscum***  
***S. bovista***

Agaricomycetes *incertae sedis*

Thelephorales

Thelephoraceae

- ➔ ***Tomentella***  
***T. botryoides***

Russulales

Russulaceae

- ➔ ***Russula***  
***R. laccata***

## Danksagung

Mein herzlicher Dank gilt meinen Betreuerinnen Dr. Christel Baum und Dr. Christine Struck für Ihre Unterstützung und Motivation bei der Umsetzung meiner Arbeit. Des Weiteren bedanke ich mich bei Prof. Dr. Bärbel Gerowitt und Prof. Dr. Peter Leinweber für die Möglichkeit in den Räumlichkeiten Ihrer Abteilungen zu forschen.

Finanziell wurde mir mein Promotionsstipendium von der Interdisziplinären Fakultät der Universität Rostock ermöglicht. Besonders möchte ich mich bei Prof. Dr. Udo Kragl, Prof. Dr. Gerhard Graf, Dr. Andrea Schüch, Dr. Frank Hansen, Dr. Manuela Görs und Dr. Friederike Kunz bedanken. Anja Gloede danke ich für ihr stets offenes Ohr und ihr Engagement für uns Stipendiaten.

Den Kolleginnen und Kollegen der Bodenkunde sowie der Phytomedizin danke ich für die freundliche Aufnahme in ihre Abteilungen; besonders hervorheben möchte ich: Kai-Uwe Eckhardt, Dr. Rolf Beese und Dr. André Schlichting für die Analysen mittels Py-FIMS und LC-MS/MS und natürlich für die netten Gespräche. Elena Heilmann danke ich für die Messung meiner Blatt- und Bodenproben am Vario EL CNS-Analyzer. Mein herzlicher Dank gilt besonders den guten Seelen der Bodenkunde, Johanna (Hanne) Meincke, und der Phytomedizin, Martina Goltermann, für das stets offene Ohr und die vielen guten Worte.

Prof. Dr. Martin Weih aus dem hohen Norden (Uppsala) danke ich für seine Unterstützung, die er mir vom Anfang bis zum Ende meiner Arbeit entgegengebracht hat. Des Weiteren danke ich Ihm und seiner Frau für die herzliche Aufnahme während meines Aufenthalts in Uppsala.

Dr. Andreas Gurgel von der Landesforschungsanstalt für Landwirtschaft und Fischerei (LFA) Mecklenburg-Vorpommern in Gülzow danke ich für die gute Zusammenarbeit.

Ein besonderer Dank gilt Dr. Pascal Frey von der INRA Nancy-Lorraine sowie seiner Frau Dr. Pascale Frey-Klett, die mir meinen Forschungsaufenthalt in der INRA ermöglicht haben. Pascal danke ich für die herzliche Aufnahme in der Abteilung „Interactions Arbres-Microorganismes“ und die tolle Organisation sowie die vielen Methoden, die er und viele Mitarbeiter der INRA mir gezeigt haben.

Der Abteilung Pflanzenphysiologie unter der Leitung von Prof. Dr. Hermann Bauwe danke ich für die kollegiale Hilfe bei der Umsetzung einiger Ideen.

Den Stipendiaten des Departments Maritime Systeme danke ich für die tolle Zeit, die wir miteinander verbracht haben; auch außerhalb der Uni. Jan, Tim-Åke und Franziska danke ich für unsere gemeinsame Zeit als Sprecherteam des MTS. Ganz besonders danke ich Juliane für ihr stets offenes Ohr – auch in der finnischen Kälte :-)) und nach meinem Umzug

## Danksagung

in den Süden. Alles wird gut, gell?! Meiner ehemaligen „Büromitbewohnerin“ und Mitstipendiatin Antje danke ich für den „Südwind“ in unserem Büro. Es war eine schöne Zeit! Becke, Jens, Diego, Rosa sowie Silvia, Mathias und Dana danke ich für die schönen Ausflüge/Abende und die aufbauenden Worte, wenn wieder ein Versuch von den falschen Pathogenen in die Knie gezwungen wurde.

Meiner Cousine Anne-Dore danke ich von Herzen, dass sie immer für mich da war und zu jeder Zeit die passenden (aufmunternden) Worte bei der Hand hatte. Und last but not least danke ich meinen Eltern für ihren Zuspruch und ihr Verständnis während meiner Arbeit - was sicherlich nicht immer einfach war. Danke!

## Thesen der Dissertation

### Hintergrund der Arbeit

Weiden (*Salix* spp.) und besonders Pappeln (*Populus* spp.) sind sowohl wirtschaftlich bedeutsam für die Biomasseproduktion als auch detailliert genetisch und physiologisch beschriebene Modellorganismen und eignen sich daher sehr für die Beantwortung komplexer ökophysiologische Fragestellungen. Beide Baumarten wachsen auf ihren natürlichen Standorten sowie auch nach Pflanzung auf Ackerflächen in Symbiose mit Mykorrhizapilzen. Dabei ist Ektomykorrhizierung der dominierende Mykorrhizierungstyp. Rostpilzbefall, verursacht durch die Infektion mit *Melampsora* spp., gehört zu den wirtschaftlich bedeutsamsten Krankheiten von Weiden und Pappeln. Der Anbau resistenter Klone ist eine wirkungsvolle aber zeitlich befristete Lösung, da die Resistenz standortspezifisch variiert und nach ca. 10 Jahren von Pathogenen mit veränderten Virulenzen überwunden werden kann.

### Thesen zur Zielstellung der Arbeit

- 1) Die Symbiose mit Mykorrhizapilzen kann die Nährstoffversorgung der Wirtspflanzen verbessern und den Kohlenstoffhaushalt durch erhöhten Assimilatverbrauch verändern.
- 2) Mykorrhizapilze als Symbionten und Rostpilze als Parasiten beeinflussen sich indirekt über pflanzenphysiologische Mechanismen, wenn sie die gleiche Wirtspflanze besiedeln.
- 3) Richtung und Ausmaß der Wirkung von Mykorrhizapilzen auf die Resistenz von Weiden und Pappeln gegenüber Rostpilzinfektion könnten als wirtschaftlich wichtige Indikatoren für die Resistenzentwicklung dieser Baumarten im Anbau genutzt werden.
- 4) Pflanzenphysiologische Modellsysteme unter definierten Umweltbedingungen und definierten Kombinationen von Einzelorganismen (z. B. Modellorganismen) eignen sich besonders, um die Richtung und die Potenziale komplexer biotischer Interaktionen zu untersuchen.

### **Thesen, die aus den Forschungsergebnissen abgeleitet werden**

- 5) Sowohl Mykorrhizierung als auch Rostpilzinfektion können über erhöhte Anteile kondensierter Tannine an den Gesamtphenolen in den Blättern der Wirtspflanze zu resistenzsteigernden blattchemischen Veränderungen führen.
- 6) Ektomykorrhizierung kann in der Wirtspflanze zu einer erhöhten Produktion von Flavonoiden und Lipiden, die zur Abwehr von Rostpilzinfektionen beitragen, führen und deren selektiven Verringerung nach Rostpilzinfektion verhindern.
- 7) Ergebnisse aus pflanzenphysiologischen Modellsystemen bedürfen einer Verifizierung unter Freilandbedingungen mit Berücksichtigung variabler Umweltbedingungen und einer erhöhten Diversität von biotischen Interaktionen.
- 8) Da die Wirkung von Mykorrhizierung in Abhängigkeit von Umweltfaktoren (Bodeneigenschaften und Witterungsbedingungen) und der Kombination der Genotypen von Wirtspflanze und Mykorrhizapilzen stark variiert, kann im Freiland keine allgemeingültige Bedeutung von Mykorrhizierung für die Resistenz von Weiden und Pappeln gegenüber Rostpilzinfektion nachgewiesen werden.
- 9) Die Produktion von Sekundärmetaboliten, die zur Resistenz von Weiden und Pappeln gegenüber Rostpilzen beitragen, wird in erster Linie durch den Genotyp der Pflanze und die standortspezifische Nährstoffversorgung beeinflusst.
- 10) Die Mykorrhizierungsrate mit dem Pilzpartner *Scloderma bovista* ist ein möglicher Indikator für die Rostpilzanfälligkeit von Weiden- und Pappelklonen, jedoch ist die Richtung des Zusammenhangs von den Interaktionen mit den Genotypen (Sorten) beeinflusst.

### **Schlussfolgerung**

- 11) Auf Standorten mit optimaler Nährstoffversorgung ist auf Grund der sinkenden Bedeutung der Mykorrhizierung für die Pflanzenernährung generell kein kausaler Zusammenhang zwischen Mykorrhizierung und Resistenz gegen Rostpilzinfektion zu erwarten.
- 12) Die Genotyp-spezifisch variierende Mykorrhizierungsneigung der Sorten kann ein möglicher Indikator für die Stresstoleranz auf Standorten mit ungünstigen Umweltbedingungen und deren Wirkung auf die Rostpilzinfektion darstellen. Folgeuntersuchungen sollten sich daher auf Testpflanzen mit abiotischem Stress konzentrieren.
- 13) Da die Mykorrhizierungsrate der Pilzart *Scloderma bovista* in signifikantem Zusammenhang mit der Rostpilzanfälligkeit von Weiden- und Pappelklonen steht und aus der Referenzliteratur dieser Art bekannt ist, dass neben der mutualistischen

Symbiose auch eine parasitische Besiedlung der Pflanzenwurzeln auftreten kann, ist diese Pilzart ein besonders geeigneter Modellorganismus für Folgeuntersuchungen zum Zusammenhang von Mykorrhizierung und Rostpilzinfektion.

- 14) Die Selektion stresstoleranter Weiden- und Pappelklone unter Berücksichtigung von multitrophen Interaktionen, wie die von Symbiosepartnern und Pathogenen an gemeinsamen Wirtspflanzen, kann wertvolle Hinweise für die Züchtung nachhaltiger, leistungsstarker Sorten liefern.